

Kovalent funktionalisierte Calciumphosphat-Nanopartikel zur selektiven Adressierung von Zellen

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
- Dr. rer. nat. -

vorgelegt von

Diana Kozlova

geboren in Lettland, Daugavpils

Institut für Anorganische Chemie
der
Universität Duisburg-Essen

2014

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Juli 2010 bis Juni 2014 im Arbeitskreis von Prof. Dr. Matthias Epple am Institut für Anorganische Chemie der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

1. Gutachter:	Prof. Dr. M. Epple
2. Gutachterin:	Prof. Dr. A. M. Westendorf
3. Gutachter:	Prof. Dr. M. Gelinsky
 Vorsitzender:	 Prof. Dr. G. Jansen
 Tag der mündlichen Prüfung:	 02.12.2014

Meinem Bruder Vitaliy Kozlov

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis.....	V
Einleitung	1
Theoretische Grundlagen.....	3
2.1 Nanopartikuläre Trägersysteme für die biologische Anwendung	3
2.2 Charakterisierung der kolloidalen Systeme	4
2.3 Calciumphosphat-Nanopartikel.....	7
Ergebnisse und Diskussion	9
3.1 Silica-funktionalisierte Calciumphosphat-Nanopartikel.....	9
3.1.1 Modifizierung mit SiO ₂ -Gruppen	10
3.1.2 Funktionalisierung der SiO ₂ -modifizierten Nanopartikel	16
3.2 Konjugation der Nanopartikel mit Farbstoffen	22
3.2.1 Konjugation mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC)	22
3.2.2 Konjugation mit dem pH-sensitiven Farbstoff SNARF-1	29
3.3 Hemmung der zellulären Aufnahme der Nanopartikel	37
3.4 Anwendung der Nanopartikel für <i>in vivo</i> Bildgebung und PDT.....	44
3.4.1 DY-682-markierte Nanopartikel.....	45
3.4.2 Beladung der DY-682-markierten Nanopartikel mit dem Photosensibilisator	52
3.4.3 mTHPC-beladene und DY-682-markierte Nanopartikel	54
3.4.4 RGDfK-konjugierte multifunktionelle Nanopartikel	62
3.4.5 Einsatz der multifunktionellen Nanopartikel in PDT	65
3.5 Beladung der Nanopartikel mit Biomolekülen	69
3.5.1 Mit Fluoreszenz-markiertem CpG beladene Nanopartikel.....	71
3.5.2 Beladung mit DNA-EGFP zur Transfektion	74
3.6 Flagellin-beladene Nanopartikel zur <i>in vitro</i> - und <i>in vivo</i> -Aktivierung der Immunantwort	81
3.6.1 Flagellin zur Aktivierung von TLR5 und NLRC4	81
3.6.2 Charakterisierung der Flagellin-beladenen Nanopartikel.....	84
3.6.3 <i>In vitro</i> Aktivierung der Immunantwort	87
3.6.4 <i>In vivo</i> Aktivierung der Immunantwort.....	90

3.7 Konjugation der Nanopartikel mit Antikörpern zur selektiven	
Zelladressierung.....	93
3.7.1 Moleküle zum Targeting	93
3.7.2 Konjugationsmöglichkeiten	95
3.7.3 Passives Targeting.....	97
3.7.4 Aktives Targeting.....	98
3.7.5 Konjugation der Nanopartikel mit Antikörpern	100
3.7.6 Zellaufnahmen von Antikörper-konjugierten Nanopartikeln.....	103
3.7.7 Transfektion von Antikörper-konjugierten und DNA-beladenen	
Nanopartikeln.....	104
3.7.8 Antikörper-konjugierte Nanopartikel zur selektiven	
Adressierung <i>in vitro</i>	108
3.7.9 Antikörper-konjugierte Nanopartikel zur selektiven	
Adressierung <i>in vivo</i>	110
3.8 Konjugation von Nanopartikeln mit HEL zur selektiven	
Adressierung von B-Zellen.....	111
3.8.1 Charakterisierung der HEL- und BSA-konjugierten	
Nanopartikel.....	113
3.8.2 BCR-abhängiges Targeting der Protein-konjugierten	
Nanopartikel.....	118
3.8.3 Aufnahme der HEL-konjugierten Nanopartikel mit B-Zellen.....	121
3.8.4 Verlust von CD62L bei Antigen-spezifischen B-Zellen	123
3.8.5 Aktivierung der Antigen-spezifischen B-Zellen	125
3.9 miRNA-beladene Nanopartikel zur Stummschaltung von Survivin	
in Neuroblastomen	127
3.9.1 Zielerkennung und regulatorische Funktionen von miRNA	127
3.9.2 Charakterisierung der miRNA-beladenen Nanopartikel.....	129
3.9.3 <i>In vivo</i> Ergebnisse der miRNA-beladenen Nanopartikel	131
Materialien und Methoden.....	135
4.1 Synthese und Funktionalisierung der Calciumphosphat-	
Nanopartikel	135
4.1.1 PEI-stabilisierte Calciumphosphat-Nanopartikel.....	135
4.1.2 SiO ₂ -modifizierte Calciumphosphat-Nanopartikel	135

4.1.3 NH ₂ -funktionalisierte Calciumphosphat-Nanopartikel	136
4.1.4 SH-funktionalisierte Calciumphosphat-Nanopartikel	136
4.1.5 FITC-konjugierte Calciumphosphat-Nanopartikel	136
4.1.6 SNARF-konjugierte Calciumphosphat-Nanopartikel.....	137
4.1.7 DY-682-markierte Calciumphosphat-Nanopartikel	137
4.1.8 DY-682-markierte und mTHPC-beladene Calciumphosphat-Nanopartikel.....	138
4.1.9 RGD-konjugierte multifunktionelle Calciumphosphat-Nanopartikel.....	139
4.1.10 Plasmid-DNA-beladene Calciumphosphat-Nanopartikel.....	139
4.1.11 CpG-beladene Calciumphosphat-Nanopartikel	140
4.1.12 Flagellin-beladene Calciumphosphat-Nanopartikel	141
4.1.13 Antikörper-konjugierte Calciumphosphat-Nanopartikel	141
4.1.14 Protein-konjugierte Calciumphosphat-Nanopartikel.....	142
4.1.15 Synthese der dreischaligen CpG-beladenen Calciumphosphat-Nanopartikel	143
4.1.16 Synthese der dreischaligen miRNA-beladenen Calciumphosphat-Nanopartikel	144
4.2 Zellbiologische Methoden	145
4.2.1 Kultivierung der sekundären Zelllinien	145
4.2.2 Kryokonservierung der Zellen	145
4.2.3 Zellaufnahmen der PEI-Farbstoff-stabilisierten Nanopartikel ...	145
4.2.4 Zellaufnahme der FITC-konjugierten Nanopartikel	146
4.2.5 Zellaufnahme der positiv und negativ geladenen Nanopartikel .	146
4.2.6 Hemmung der Partikelaufnahme durch die Zugabe von Inhibitoren	147
4.2.7 Lokalisierung der SNARF-konjugierten Nanopartikel in Zellen .	148
4.2.8 Transfektion.....	148
4.2.9 MTT-Test.....	149
4.2.10 Zellaufnahme der CpG-Farbstoff-beladenen Nanopartikel.....	149
4.2.11 DY-682-markierte Nanopartikel zur <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> Studien	150
4.2.12 DY-682-markierte und mTHPC-beladene Nanopartikel	151

4.2.13 PDT der Xenograft-tragenden Mäuse nach Behandlung mit multifunktionellen Nanopartikeln	151
4.2.14 Detektion der apoptotischen Zellen im Tumor nach PDT.....	152
4.2.15 Vaskularisierung und Reduktion des Tumors nach PDT.....	152
4.2.16 <i>In vivo</i> -Verteilung von DY-734-Annexin V und IRDye® 800CW RGD	153
4.2.17 Biologische Untersuchungen der Antikörper-konjugierten Nanopartikel.....	153
4.2.18 Stimulierung von IL-8 und IL-1 β durch Flagellin-beladene Nanopartikel <i>in vitro</i>	154
4.2.19 Stimulierung von IL-6 durch Flagellin-beladene Nanopartikel <i>in vivo</i>	155
4.2.20 Biologische Untersuchungen der Protein-konjugierten Nanopartikel.....	156
4.2.21 miRNA-beladene Nanopartikel zur Hemmung von Survivin in Neuroblastomen <i>in vivo</i>	157
4.3 Physikochemische Methoden	159
4.3.1 Dynamische Lichtstreuung und Zetapotential	159
4.3.2 Rasterelektronenmikroskopie	160
4.3.3 Energiedispersive Röntgenspektroskopie	161
4.3.4 Konfokale Laser-Scanning Mikroskopie	161
4.3.5 Fluoreszenzmikroskopie	162
4.3.6 Durchflusszytometrie	163
4.3.7 UV-Vis-Spektroskopie	165
4.3.8 Infrarot-Spektroskopie	165
4.3.9 Atomabsorptionsspektroskopie und Elementaranalyse	166
4.3.10 Lyophilisation (Gefriertrocknung)	167
Zusammenfassung.....	168
Summary	171
Literaturverzeichnis.....	173
Anhang	190

Abkürzungsverzeichnis

AAS	Atomabsorptionsspektroskopie
AK	Antikörper
APC	Allophycocyanin
APTES	3-Aminpropyltriethoxysilan
BCR	B-Zellrezeptor (engl. <i>B-cell receptor</i>)
BSA	Rinderserumalbumin (engl. <i>bovine serum albumin</i>)
CAL	Zungen-Plattenepithel-Karzinom-Zellen
CaP	Calciumphosphat
CLSM	Konfokale Laser-Scanning Mikroskopie
DAPI	4',6'-Diamidin-2-phenylindol
DC	Dendritische Zellen
DLS	Dynamische Lichtstreuung (engl. <i>dynamic light scattering</i>)
DMEM	<i>Dubelcco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOTAP	N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium-methylsulfat
EA	Elementaranalyse
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimid
EDX	Energiedispersive Röntgenspektroskopie
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunsorbent Assay</i>
EPR	Erhöhte Permeabilität und Retention (engl. <i>enhanced permeability and retention</i>)
EtOH	Ethanol
FACS	Durchflusszytometrie (engl. <i>fluorescence activated cell sorting</i>)
FBS	Bovines Rinderserum
FCS	Fetales Kälberserum
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>

H&E	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HEL	<i>Hen egg lysozyme</i>
IL	Interleukin
Ipaf	<i>ICE protease activating factor</i>
i.p.	Intraperitoneale Applikation
IR	Infrarot
i.v.	Intravenöse Applikation
LAMP	Lysosomal-assoziiertes Membranprotein (engl. <i>lysosomal-associated membrane protein</i>)
LPS	Lipopolysaccharide
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
MPS	3-Thiolpropyltrimethoxysilan
mTHPC	5,10,15,20-Tetrakis-(3-hydroxyphenyl)-chlorin
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium-bromid
MW	Molekulargewicht
MYCN	<i>v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene neuroblastoma derived homologue</i>
NIR	Nahinfrarot
NIRF	Nahinfrarot-Fluoreszenz
NLRC	Nod-ähnlicher Rezeptor (engl. <i>nod-like receptor</i>)
nm	Nanometer
NP	Nanopartikel
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular pattern</i>
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PDI	Polydispersitätsindex
PDT	Photodynamische Therapie
PEI	Polyethylenimin
PLF	Peritoneale Lavage-Flüssigkeit
PRR	<i>Pattern-recognition receptor</i>
RAG	Rekombination-aktivierendes Gen
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>

RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
SNARF	Carboxysemaphtho-rhodafluor-1
sulfo-SMCC	Sulfosuccinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)-cyclohexan-1-carboxylat
TEOS	Tetraethylorthosilicat
TLR	Toll-ähnlicher Rezeptor (engl. <i>toll-like receptor</i>)
UV	Ultraviolett
Vis	<i>Visible</i>
VLP	Virusähnliche Partikel (engl. <i>virus-like particles</i>)
WB	Western Blot
WT	Wildtyp

Einleitung

Nanotechnologie beinhaltet die Herstellung, Untersuchung und Anwendung der Strukturen im Größenbereich von 1-100 nm. Die Anwendung der Nanotechnologie in der Medizin, die als Nanomedizin bezeichnet wird, umfasst die Verwendung der nanoskaligen Strukturen zur Entwicklung von neuen therapeutischen Trägersystemen.¹⁻⁴ Zu diesen Trägersystemen zählen einerseits Liposome, Polymermizellen, Dendrimere und Polymer-Wirkstoff-Konjugate. Andererseits finden feste Trägersysteme in Form von Nanopartikeln und Nanokapseln breite Verwendung. Die Vielzahl von Nanopartikeln mit gezielten Oberflächeneigenschaften und die Möglichkeit, diese mit verschiedenen Verbindungen oder Wirkstoffen zu konjugieren oder zu beladen, stellt Nanopartikel als Trägersystem für ein breites Spektrum der biologischen und biomedizinischen Anwendungen dar. Die Konjugation mit verschiedenen Molekülen kann die Eigenschaften der Nanopartikel verbessern und eine zielgerichtete Adressierung der modifizierten Nanopartikel zu verschiedenen Zelltypen und Geweben ermöglichen (Abb. 1).

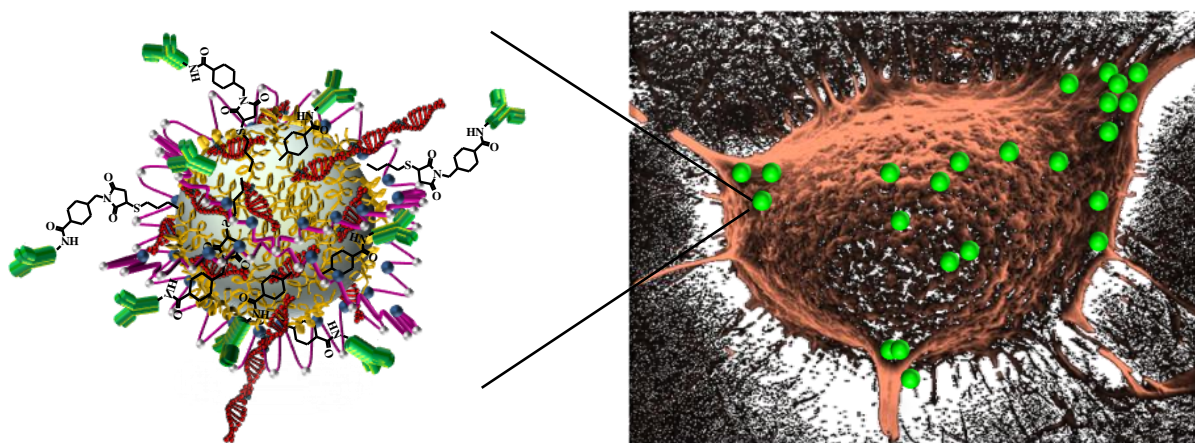


Abb. 1: Schematische Darstellung von funktionalisierten Nanopartikeln zur Adressierung von Zellen.

Die intensive Entwicklung von Nanomaterialien in letzten Jahrzehnten bietet Herstellungsmöglichkeiten der multifunktionellen Nanopartikel für den zielgerichteten Transport von Arzneistoffen (*drug delivery*), für neue Therapieverfahren und für *in vitro*- und *in vivo*-Diagnostik der wichtigsten Erkrankungen, einschließlich Krebsdiagnose und -therapie.^{4, 5} Jedoch ist die

biologische Aktivität solcher Nanostrukturen von ihrer Größe, Form, Oberflächenchemie, Funktionalisierung und chemischen Zusammensetzung abhängig.^{6, 7} Zu den Untersuchungen dieser Faktoren werden nicht nur experimentelle (analytische),⁸ sondern auch Simulationsverfahren eingesetzt.⁹ In Abhängigkeit von der Anwendung werden Nanopartikel zum Transport der verschiedenen therapeutischen Wirkstoffen wie kleine Wirkstoffmoleküle^{10, 11} und Biomoleküle (Peptide, Proteine, Nukleinsäuren)¹²⁻¹⁴ eingesetzt.

In der vorliegenden Arbeit werden die Synthese und Charakterisierung von Silica-modifizierten Calciumphosphat-Nanopartikeln untersucht. Durch gezielte Oberflächenmodifikationen, Funktionalisierung mit Farbstoffen, Beladung mit Biomolekülen und Konjugation mit spezifischen Zielmolekülen werden die sphärischen Nanopartikel entsprechend den an sie gestellten Anforderungen entwickelt und untersucht.

Im Weiteren wird die Synthese und *in vivo* Anwendung von miRNA-beladenen dreischaligen Calciumphosphat-Nanopartikeln untersucht.

Theoretische Grundlagen

2.1 Nanopartikuläre Trägersysteme für die biologische Anwendung

Viele Eigenschaften und verschiedene Zusammensetzungen des nanopartikulären Systems können die Effektivität der Nanopartikel *in vitro* und *in vivo* beeinflussen. Die Partikelgröße und Größenverteilung sind die wichtigsten Eigenschaften des nanopartikulären Systems.¹⁵ Von der Partikelgröße sind viele *in vivo*-Funktionen abhängig, z.B. Neigung zur Agglomeration, zelluläre Aufnahme, intrazellulärer Transport, Abbau von Zellen oder physikochemische Auflösung, Zirkulationszeit im Körper, Immunogenität, Fließeigenschaften im Blutkreislauf und Ausscheidung aus dem Blut.^{7, 16} Nanopartikel mit einer Größe kleiner als 20-30 nm werden schnell über die Nieren ausgeschieden, während größere Nanopartikel bis zu 1 µm effizienter vom mononukleären phagozytischen System aufgenommen werden.¹⁷ Es ist wichtig zu beachten, dass die Partikel mit einer Größe von 150-300 nm im Wesentlichen in die Leber und Milz gelangen. Mit einer Größe von 30-150 nm sind die Partikel im Knochenmark, Herz, Magen und Nieren zu finden. Ebenfalls müssen die Partikel kleiner als 150 nm sein, um die endotheliale Barriere zu überwinden.¹⁸

Im Weiteren sind die Oberflächeneigenschaften der Partikel ein entscheidender Faktor für das Verhalten der Nanopartikel und deren Wechselwirkungen mit Proteinen und Zellen.^{19, 20} Die kolloidale Stabilität der Nanopartikel ist direkt von Ladung, Hydrophobie und funktionellen Gruppen abhängig. Die elektrostatische Stabilisierung kann durch das Zetapotential abgeschätzt werden. Ab einem Zetapotentialwert über ± 30 mV bleiben die Partikel in Dispersion stabil, da die Aggregation der Partikel durch die Oberflächenladung verhindert wird.¹⁶ Weiterhin wird auch die *in vivo*-Verteilung der Nanopartikel durch deren Oberflächenladung geregelt.²¹ Ungeladene Nanopartikel binden weniger Protein an die Oberfläche als positiv oder negativ geladene Äquivalente.^{22, 23} Während der Zirkulationszeit im biologischen

Medium können die Nanopartikel mit verschiedenen Biomolekülen, wie Proteinen, Nukleinsäuren, Lipiden und biologischen Metaboliten, aufgrund der geringen Größe und großen spezifischen Oberfläche interagieren. Diese Proteine können auf der Oberfläche der Nanopartikel adsorbieren und eine sogenannte Protein-Korona bilden.²⁴⁻²⁶

2.2 Charakterisierung der kolloidalen Systeme

Die kolloidale Verteilung der in einer kontinuierlichen Phase dispergierten Partikel ist nur stabil, solange die Partikel durch die abstoßende Kräfte auseinander gehalten werden. Gegenwärtig sind die elektrostatische und sterische Stabilisierung der Partikel bekannt. Die sterische Stabilisierung tritt auf, wenn Polymere (durch Adsorption oder kovalente Bindung) an die Partikeloberfläche gebunden sind.²⁷ Die Stabilisierung erfolgt durch die Erhöhung der freien Energie für die Annäherung von zwei sterisch stabilisierten Teilchen durch strukturelle oder osmotische Kräfte. Da ein System immer eine maximale Entropie anstrebt, werden die Partikel einen gewissen Abstand zueinander behalten. Allerdings ist diese Schutzwirkung der Polymere von der eingesetzten Polymerkonzentration abhängig. Die Stabilität der Kolloide ist für unterschiedliche Polymerkonzentrationen in Abbildung 2 dargestellt. Bei zu geringer Polymerkonzentration kommt es zu so genannter Brückenflockung (Abb. 2A). Die Zugabe des Polymers in einer optimalen Konzentration führt zu einer sterischen Stabilisierung des Systems (Abb. 2B). Durch eine weitere Erhöhung der Polymerkonzentration erhält man die Verminderungsflockung und die Verminderungsstabilisierung (Abb. 2C und D).

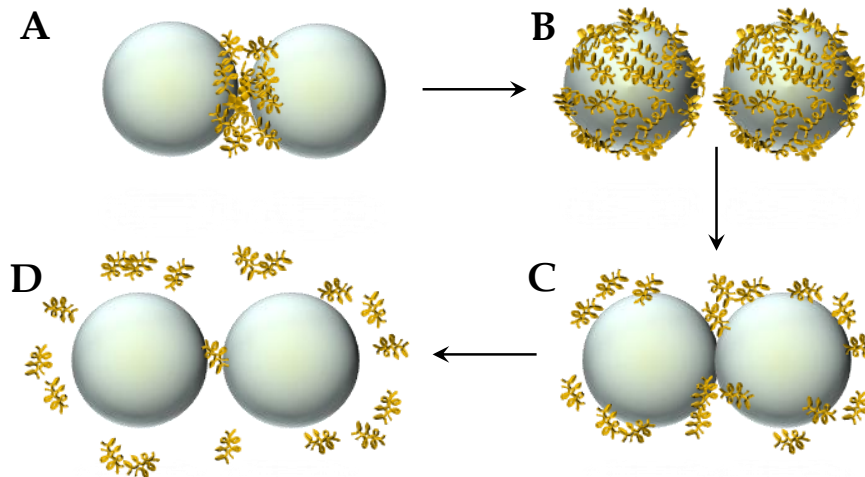


Abb. 2: Schematische Darstellung der Auswirkungen verschiedener Polymerkonzentrationen auf die Stabilität kolloidaler Systeme. A: Brückenflockung bei zu geringer Polymerkonzentration; B: sterische Stabilisierung bei ausreichender Polymerkonzentration; C: Verminderungsflockung bei höherer Polymerkonzentration; D: Verminderungstabilisierung bei sehr hoher Polymerkonzentration. ²⁸

Zur elektrostatischen Stabilisierung müssen auf der Partikeloberfläche Ladungen vorhanden sein. Die Stabilisierung beruht auf der elektrostatischen Abstoßung der elektrochemischen Doppelschichten an der Oberfläche zwischen den einzelnen Nanopartikeln. Dem entgegen wirkt die Van-der-Waals-Anziehung zwischen den Partikeln. Die elektrostatische Abstoßung ist abhängig von der Stärke des Sternpotentials und von der Dicke der elektrochemischen Doppelschicht. Der Aufbau der elektrochemischen Doppelschicht und der Potentialverlauf als Funktion des Abstands zur Partikeloberfläche sind schematisch in Abbildung 3 am Beispiel einer negativ geladenen Partikeloberfläche dargestellt. Im dargestellten Fall wird die Oberflächenladung der Partikel durch im Dispersionsmittel enthaltene Ionen teilweise kompensiert und bewirkt eine Ausrichtung dipolarer Moleküle (z.B. Wassermoleküle) nahe der Partikeloberfläche. Dadurch bildet sich eine elektrochemische Doppelschicht entgegengesetzter Ladungen aus (Sternschicht). Weitere Gegenionen bilden um die Partikel mit der elektrochemischen Doppelschicht eine lockere diffuse Schicht aus. Das elektrische Potential für die Gegenionen, die sich direkt an der Oberfläche

der adsorbierten Ionen anlagern, fällt linear ab und nähert sich schließlich in einem exponentiellen Abfall dem Wert Null.

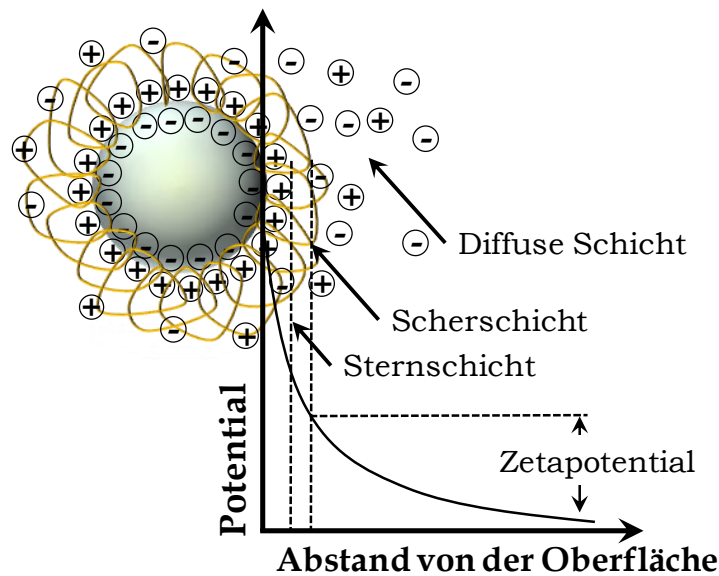


Abb. 3: Aufbau der elektrochemischen Doppelschicht an einer negativ geladenen Partikeloberfläche in einem Dispersionsmedium.

Das Stabilitätsverhalten von Dispersionskolloiden wird durch die DLVO-Theorie beschrieben (DLVO von Derjaguin, Landau, Verwey und Overbeek). Die Stabilität kolloidaler Dispersionen ergibt sich demnach aus der additiven Überlagerung der anziehenden Van-der-Waals-Wechselwirkungen und der elektrostatischen Abstoßungskräfte. Das daraus folgende Gesamtwechselwirkungspotential kann als Funktion des Abstandes dargestellt werden (Abb. 4). Die Potentialkurve durchläuft in Abhängigkeit vom Abstand zunächst ein primäres Minimum und dann ein Maximum. Die Stärke des Maximums der Potentialkurve ist von der Dicke der elektrochemischen Doppelschicht abhängig. Das primäre Maximum ist ein Maß für die Stabilität der Dispersion. Je höher diese sogenannte Energiebarriere ist, umso stabiler ist die Dispersion. Sowohl am primären, als auch am sekundären Minimum können die Partikel agglomerieren.

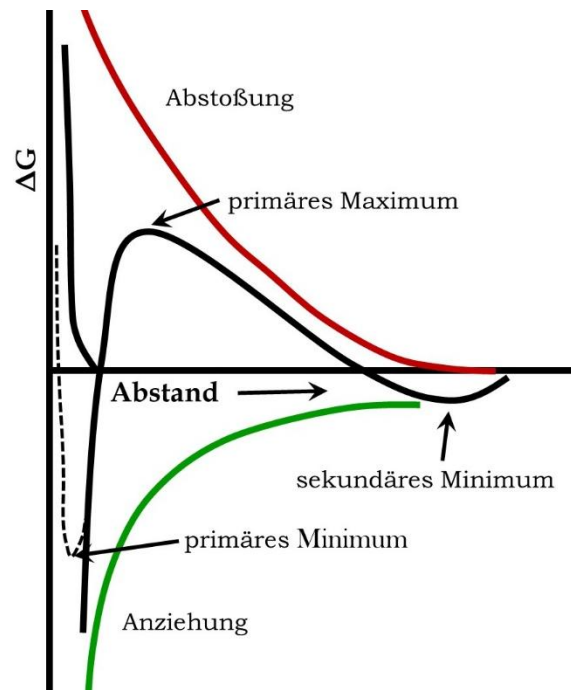


Abb. 4: Potentialverlauf zwischen zwei Teilchen einer kolloidalen Dispersion.

Um eine effektive Stabilisierung zu erreichen, müssen die abstoßenden Wechselwirkungen so stark ausgeprägt sein, dass die Partikel den Abstand des Maximums nicht überwinden können. Eine negative Gesamtenergie führt zu unerwünschter Agglomeration und muss daher durch die Zugabe von geeigneten Stabilisatoren vermieden werden.

2.3 Calciumphosphat-Nanopartikel

Calciumphosphate kommen als anorganische Komponente von physiologischen Hartgeweben (Knochen und Zähnen) vor.²⁹ Aufgrund der hohen Biokompatibilität und biologischen Abbaubarkeit werden die Calciumphosphate als künstliche Knochenersatzmaterialien, für Beschichtungen von Implantaten und in der Zahnmedizin verwendet.³⁰

Die in der Biomedizin eingesetzten Calciumphosphate leiten sich von der Orthophosphorsäure (H_3PO_4), einer dreiprotonigen mittelstarken Säure, ab. Sie bildet primäre (Dihydrogenphosphat H_2PO_4^-), sekundäre (Hydrogenphosphat HPO_4^{2-}) und tertiäre Phosphate (Phosphat PO_4^{3-}). Diese Ionen können mit Ca^{2+} entsprechende Salze bilden. Die Calciumphosphat-Phasen

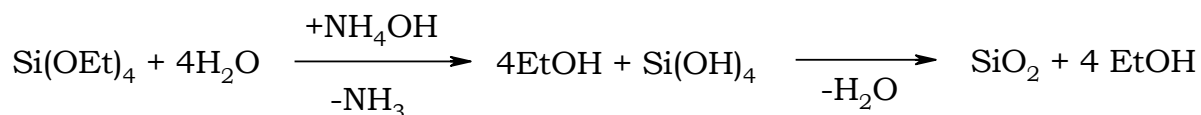
lassen sich durch unterschiedliche molare Ca/P-Verhältnisse unterscheiden. Für die stöchiometrisch zusammengesetzten Phasen werden Ca/P-Verhältnisse von 0,5-2,0 gefunden. Allgemein sind alle Calciumphosphate säurelöslich, weisen aber geringe Löslichkeit in neutralem Wasser auf.^{29, 30} Neben dem Einsatz von Calciumphosphaten als Knochenersatzmaterialien wird auch im Bereich zur Entwicklung vom Trägermaterial auf der Basis von Calciumphosphat-Nanopartikeln intensiv geforscht. Durch ein geeignetes Syntheseverfahren können die Calciumphosphat-Nanopartikel bestimmter Größe, Morphologie, Kristallinität und Stöchiometrie hergestellt werden.³¹⁻³³ Entsprechend der an die Nanopartikel gestellten Anforderungen konnten so Calciumphosphat-Nanopartikel mit gezielten Eigenschaften entwickelt werden. Beispielweise werden die Calciumphosphat-Nanopartikel als Wirkstoffträger für die zellspezifische Aufnahme von Nukleinsäuren, wie z.B. RNA oder DNA eingesetzt.^{13, 34-37} Außerdem werden die Partikel in der Immunologie für die Aktivierung von Abwehrzellen oder für die Behandlung von Tumoren mit Licht in Kombination mit einem Photosensibilisator eingesetzt.^{14, 38} Ein weiterer Vorteil liegt in der Möglichkeit, fluoreszierende Calciumphosphat-Nanopartikel durch Lanthanoiddotierung oder Markierung mit Fluoreszenzfarbstoffen (Verkapselung oder Konjugation) herstellen zu können.³⁹⁻⁴¹

Ergebnisse und Diskussion

3.1 Silica-funktionalisierte Calciumphosphat-Nanopartikel

Die vielfältigen Anwendungsmöglichkeiten der synthetisierten Calciumphosphat-Nanopartikel sind im großen Maß von der Modifikation der Oberfläche abhängig. Es gibt mehrere Verfahren zur Funktionalisierung der Oberfläche der Nanopartikel. Diese Verfahren umfassen die Adsorption von Polymeren^{33, 42} oder Biomolekülen,^{36, 43-45} die Bildung einer Schale und die kovalente Konjugation mit Molekülen, wie z.B. Antikörpern, Proteinen oder zellpenetrierenden Peptiden auf der Oberfläche der Partikel.⁴⁶⁻⁴⁹ Da die Calciumphosphate als ionische Verbindung nicht kovalent modifiziert werden können, ermöglicht eine Silica-Schale die kovalente Konjugation der Calciumphosphat-Nanopartikel mit den spezifischen Molekülen. Unter diesen Modifikationen ist die Stöber-Methode⁵⁰ die häufigst verwendete Methode für die Funktionalisierung der Nanopartikel mit einer Silica-Schale.^{51, 52} Silica ist ein vorteilhaftes Material für die Beschichtung von Nanopartikeln wegen Eigenschaften wie optischer Transparenz, chemischer Inertheit, mechanischer Stabilität, Biokompatibilität und vielseitiger Funktionalisierbarkeit.⁵³

Üblicherweise wird die Silica-Beschichtung nach dem Stöber-Prozess mit Tetraethylorthosilicat (TEOS) als Ester und Ethanol (EtOH) als Lösungsmittel durchgeführt.⁵⁴



Die Reaktionsgleichung zeigt, dass sich durch die basische Katalyse zuerst Kieselsäure und Ethanol bilden. Die folgende Kondensationsreaktion verläuft unter Wasserabgabe zu SiO₂. Durch das Anlagern von TEOS an die Oberfläche der Nanopartikel kann man diesen Prozess nutzen, um Nanopartikel mit einer Silica-Schale zu modifizieren. Zudem ist die Oberfläche der Calciumphosphat-Nanopartikel nach der Synthese mit Silanol-

gruppen abgesättigt. Das erlaubt eine weitere Funktionalisierung mit verschiedenen Silica-Precursoren, je nach den weiteren Anwendungsbedürfnissen.⁵⁵

Die Silica-Schale dient nicht nur für die weitere Funktionalisierung mit funktionalen Gruppen, sondern auch als Schutzschale für die Biomoleküle, die zwischen dem Kern der Calciumphosphat-Nanopartikel und der Silica-Schicht eingebaut werden können.

3.1.1 Modifizierung mit SiO₂-Gruppen

Um die synthetisierten Calciumphosphat-Nanopartikel mit der Silica-Schale zu modifizieren, müssen diese mit einem Polymer stabilisiert werden. Das ausgewählte Polymer muss dabei die Partikel nicht nur stabilisieren, sondern auch eine gewisse Beladungskapazität für die Biomoleküle haben. Meistens sind die Biomoleküle negativ geladen, und aus diesem Grund beschränkt sich die Auswahl auf positiv geladene Polymere. Polyethylenimin (PEI) (Abb. 5) als *in vitro* sehr häufig eingesetztes Transfektionsreagens⁵⁶ hat den Vorteil, dass es die Partikel gut stabilisiert. Zudem gibt es durch die positive Ladung des Polymers auch noch elektrostatische Wechselwirkungen mit dem Kieselsäureester, so dass dieser sich an die Partikeloberfläche anlagern kann.⁵⁷

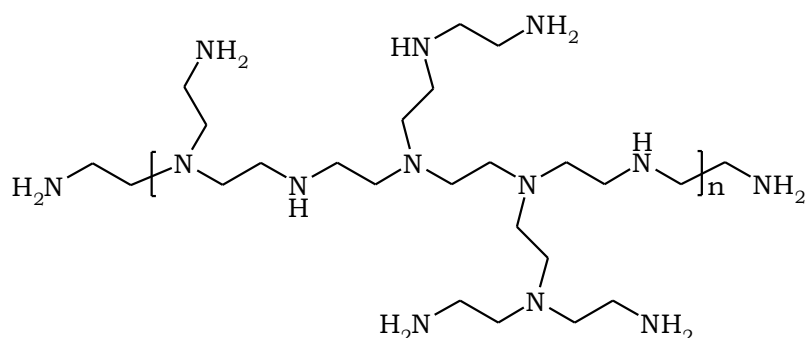


Abb. 5: Strukturformel von Polyethylenimin zur Stabilisierung der Calciumphosphat-Nanopartikel.

Der schematische Aufbau der PEI-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikel ist in Abbildung 6 dargestellt. Die erhaltenen CaP/PEI-Nanopartikel

wurden als der anorganische Kern für die nachfolgenden Modifikationen und die Beladungen mit Biomolekülen verwendet.

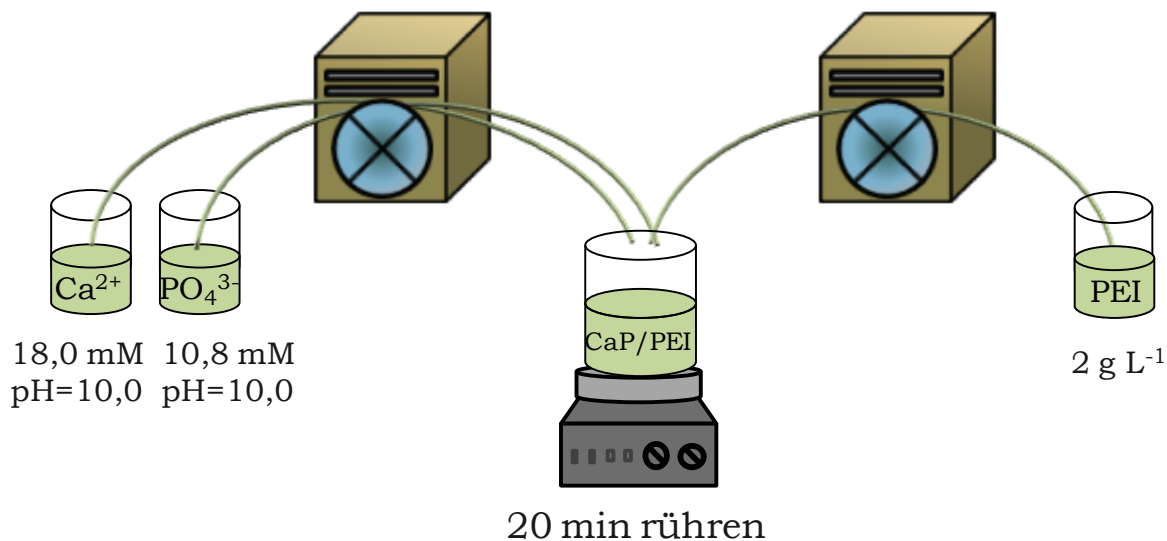


Abb. 6: Syntheseaufbau der PEI-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikel.

Die im kontinuierlichen Fällungsprozess hergestellten CaP/PEI-Nanopartikel wurden danach mit der Silica-Schale modifiziert. Abbildung 7 stellt die Modifizierung der Nanopartikel im Syntheseprozess dar.

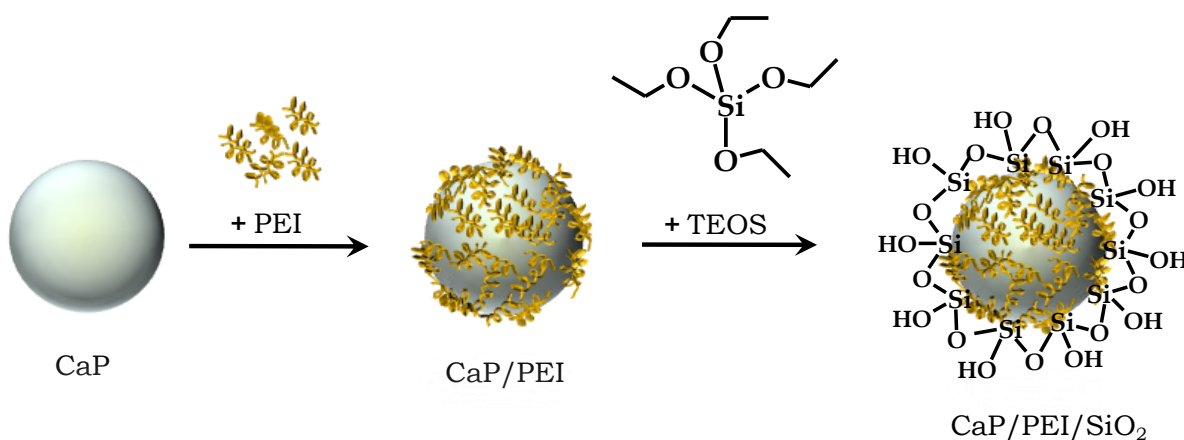


Abb. 7: Schematische Darstellung der Modifizierung von PEI-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln mit einer Silica-Schale.

Die Dispersität und Stabilität der aufgereinigten CaP/PEI/SiO₂-Nanopartikel wurden mittels dynamischer Lichtstreuung (DLS) untersucht. Der hydrodynamische Durchmesser der Nanopartikel liegt bei 150 nm mit einem Polydispersitätsindex (PDI) von 0,08, der den monodispersen Charakter des erhaltenen Systems zeigt. Das Zetapotential der SiO₂-modifizierten Nano-

partikel beträgt +15 mV. Die leicht positive Ladung der Partikel kann mit den durch die Silica-Schale penetrierenden PEI-Gruppen erklärt werden. In der Tabelle 1 sind die charakteristischen Parameter der Partikel gezeigt.

Tabelle 1: Kolloidchemische Parameter der SiO₂-modifizierten und PEI-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikel.

Probe	Durchmesser in nm (DLS)	PDI	Zetapotential in mV	Durchmesser in nm (REM)
CaP/PEI/SiO ₂	150	0,08	+15±5	70-120

Die Abbildung 8 zeigt die Größenverteilung der hergestellten Nanopartikel. In REM-Aufnahmen sind die Partikel der kugelförmigen Morphologie zu erkennen (Abb. 9). Die Partikel besitzen einen mittleren Durchmesser von 70 bis 120 nm.

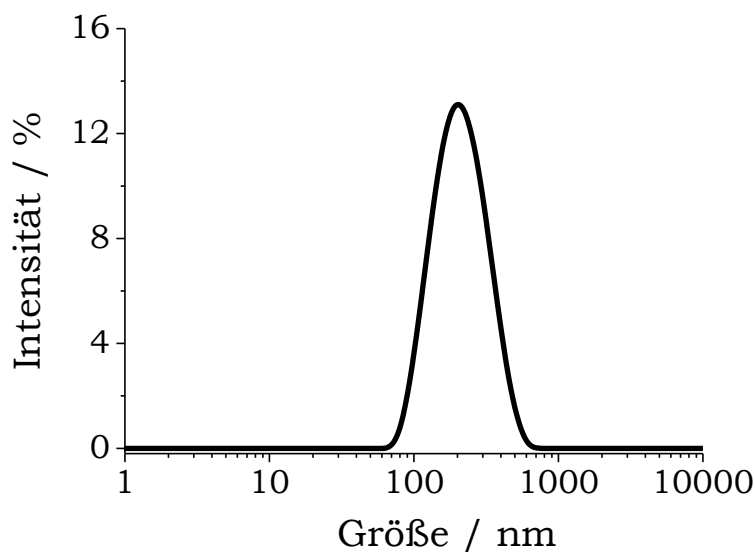


Abb. 8: Größenverteilung (DLS) der SiO₂-modifizierten und PEI-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikel.

Bei der REM-Aufnahme wird nur der anorganische Kern der Partikel abgebildet. Die DLS erfasst den hydrodynamischen Durchmesser der Nanopartikel in Dispersion. Dieser setzt sich aus dem anorganischen Calciumphosphat-Kern und den PEI- und SiO₂-Schichten zusammen. Die Differenz der gemessenen mittleren Durchmesser, die mittels DLS und REM ermittelt

wurden, liegt bei bis zu 80 nm. Das deutet auf einen gewissen Agglomerationsgrad der Nanopartikel in der Dispersion hin.

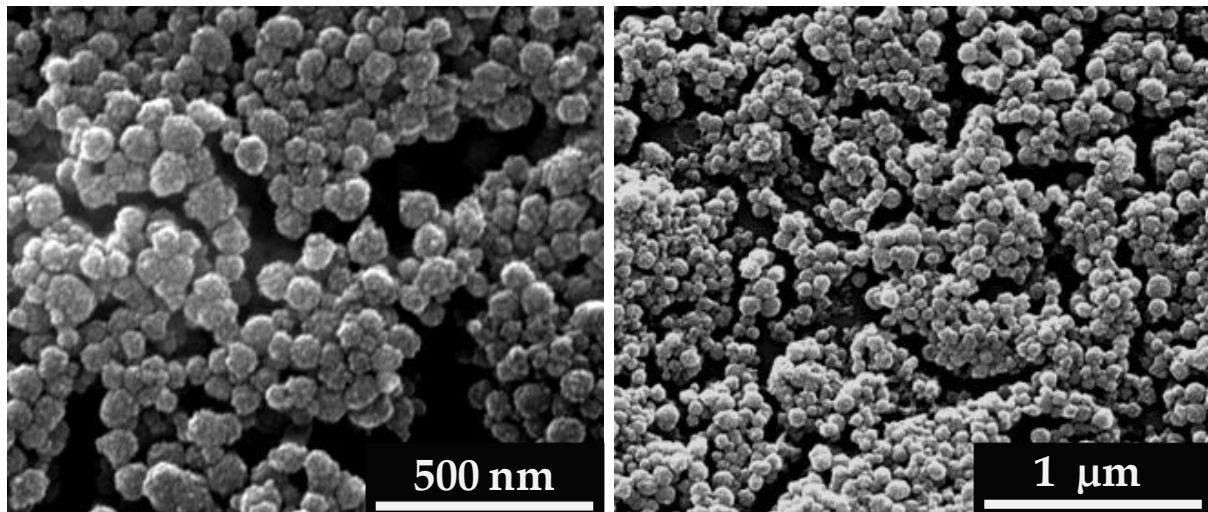


Abb. 9: REM-Aufnahmen der SiO₂-modifizierten und PEI-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikel.

Das energiedispersive Röntgenspektrum (EDX-Spektrum) der SiO₂-modifizierten Nanopartikel ist in Abbildung 10 dargestellt. Signale von Kohlenstoff, Sauerstoff, Silicium, Phosphor und Calcium wurden gefunden. Die Aluminium- und Kupfer-Signale gehören zu dem Material des Trägers.

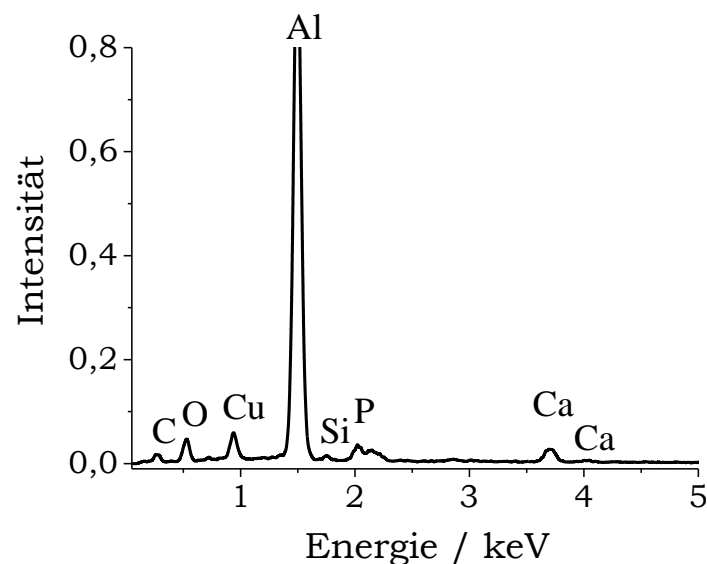


Abb. 10: Energiedispersives Röntgenspektrum der SiO₂-modifizierten und PEI-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikel.

Die Partikel bestehen zu 2,3 Gew.-% aus Silicium, zu 11,3 Gew.-% aus Phosphor und zu 20,4 Gew.-% aus Calcium. Das Stoffmengenverhältnis von

Calcium zu Phosphor beträgt 1,80. Die mittels AAS ermittelte Konzentration von Ca^{2+} beträgt $91 \mu\text{g mL}^{-1}$ im Pellet nach der Zentrifugation der Partikel, entsprechend $226 \mu\text{g mL}^{-1}$ Calciumphosphat in der Dispersion (bezogen auf stöchiometrischen Hydroxylapatit, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$).

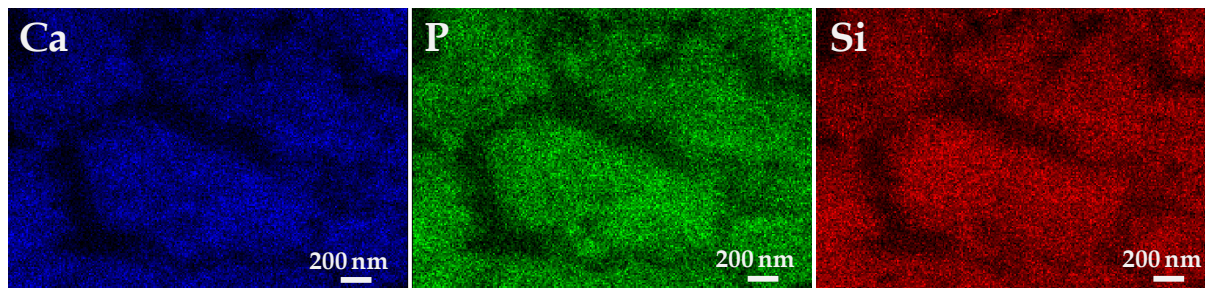


Abb. 11: EDX-Mapping der SiO_2 -modifizierten und PEI-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikel.

Die Abbildung 11 zeigt das EDX-Mapping von Calcium, Phosphor und Silicium. Die Aufnahmen zeigen eine regelmäßige Verteilung von allen drei Elementen in den Nanopartikeln nach der Modifizierung mit der Silica-Schale.

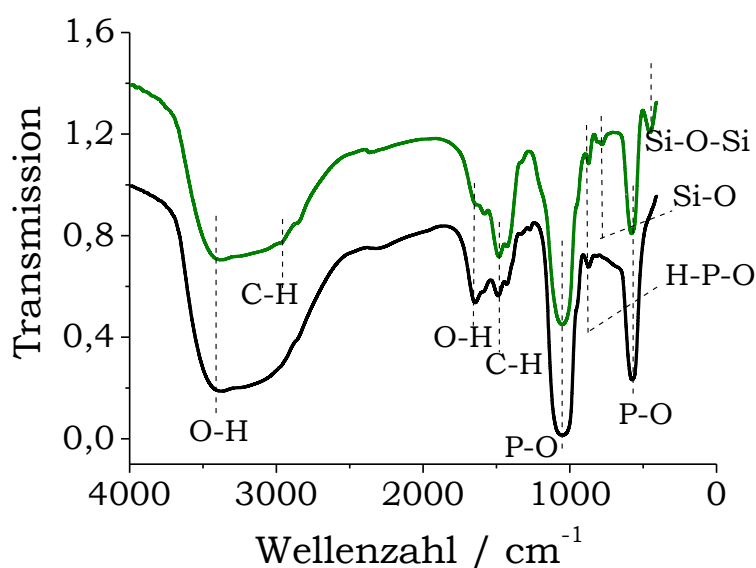


Abb. 12: Infrarotspektren der PEI-stabilisierten (schwarz) und der SiO_2 -modifizierten und PEI-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikel (grün).

Fourier-Transformations-Infrarotspektren der PEI-stabilisierten und der PEI-stabilisierten und SiO_2 -modifizierten Calciumphosphat-Nanopartikel sind in Abbildung 12 gezeigt. Die charakteristischen Banden der Phosphat- und

Hydrogenphosphat-Valenzschwingungen lassen sich bei 579, 869 und 1054 cm^{-1} Wellenzahlen erkennen. Eine schwache Bande bei 1427 cm^{-1} entspricht der C-O-Schwingung der Carbonatgruppe. Die Banden mit der Wellenzahl 1647 (Deformationsschwingung) und 3410 cm^{-1} (Streckschwingung) können adsorbiertem Wasser zugeordnet werden.⁵⁸ In den Spektren treten die Banden bei 2851 und 2958 cm^{-1} auf, welche die asymmetrischen und symmetrischen Schwingungen der CH_2 -Gruppe vom PEI darstellen. Die Bande bei 1486 cm^{-1} gehört zu der Deformationsschwingung der CH_2 -Gruppe. Die Deformationsschwingung der NH-Gruppe vom PEI liegt bei 1583 cm^{-1} .⁵⁹ Im IR-Spektrum der Silica-modifizierten Calciumphosphat-Nanopartikel lassen sich zusätzlich die Streckschwingungen der Si-O-Si-Gruppen bei einer Wellenzahl von 453 cm^{-1} erkennen.⁵²

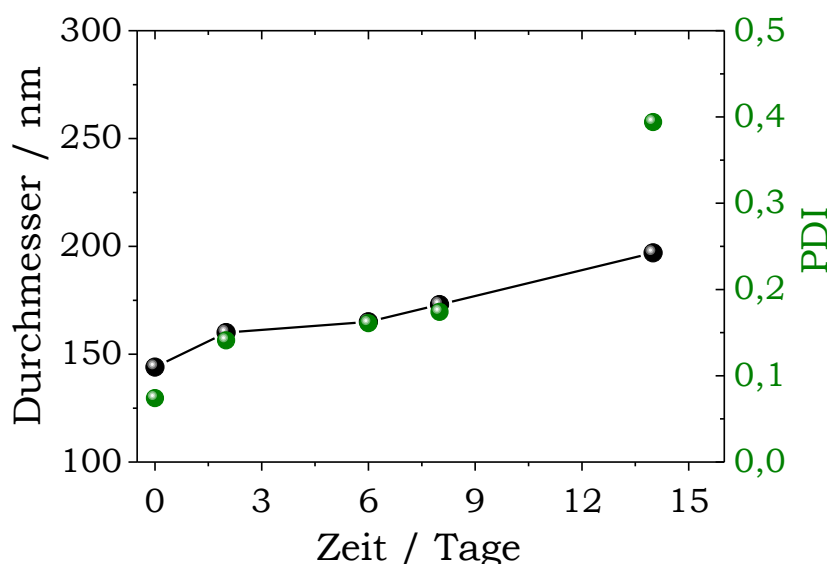


Abb. 13: Agglomerationsuntersuchungen der SiO_2 -modifizierten und PEI-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikel in Wasser in Abhängigkeit von der Zeit.

Die weiteren Funktionalisierungsmöglichkeiten der synthetisierten Nanopartikel sind stark von der Stabilität der Nanopartikel in der Dispersion abhängig. Die Stabilität der SiO_2 -modifizierten Partikel wurde im Wasser mittels DLS bestimmt. Die hydrodynamischen Durchmesser und die Polydispersitätsindizes wurden regelmäßig gemessen. Die erhaltenen hydrodynamischen Durchmesser und Polydispersitätsindizes sind in Abbildung 13 aufgetragen. Die Messdaten zeigen, dass bis zu einer Woche ein stabiles

System vorliegt. Danach zeigen die hydrodynamischen Durchmesser eine Steigerung der Messwerte, die auf eine Agglomeration der Partikel hindeutet. Die Silica-modifizierten Calciumphosphat-Nanopartikel werden im Weiteren für die Funktionalisierung mit verschiedenen funktionellen Gruppen durch die Verankerung von Silica-Precursoren verwendet.

3.1.2 Funktionalisierung der SiO₂-modifizierten Nanopartikel

Eine Funktionalisierung der Nanopartikel erweitert deren Anwendungsmöglichkeit in vielen biologischen Einsatzgebieten. Weiterhin ermöglicht die Modifizierung der Oberfläche die Konjugation mit reaktionsfähigen funktionellen Gruppen. Man unterscheidet zwei Modifizierungskonzepte der Partikeloberfläche: *post*-Modifizierung und *in-situ*-Modifizierung. *Post*-Modifizierung ist eine Modifizierung der angefertigten Nanopartikel. *In situ*-Modifizierung wird wiederum während der Partikelsynthese durchgeführt.⁶⁰ Die hier hergestellten Nanopartikel wurden *in situ* modifiziert.

Für die Funktionalisierung der SiO₂-modifizierten Calciumphosphat-Nanopartikel mit Amino-⁶¹⁻⁶⁴ oder Thiolgruppen^{46, 47} werden dementsprechend 3-Aminopropyltriethoxysilan (APTES) oder 3-Mercaptopropyltrimethoxysilan (MPS) als Precursor verwendet. Die Verankerung der Nanopartikel mit diesen Gruppen verändert deren Eigenschaften in physiologischen Medien⁶⁵ und macht sie leicht modifizierbar mit unterschiedlichen Farbstoffen und bioaktiven Molekülen.

Die schematische Funktionalisierung der Oberfläche von Nanopartikeln mit Amino- oder Thiolgruppen ist in Abbildung 14 dargestellt.

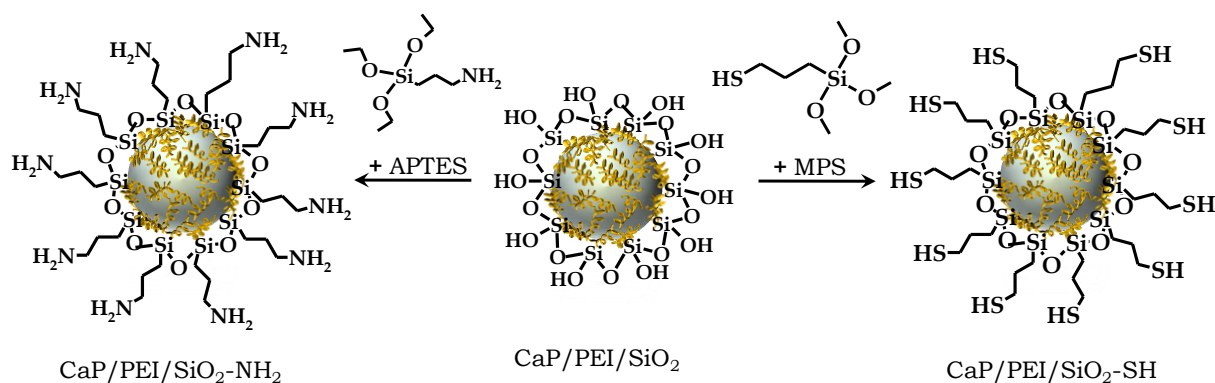


Abb. 14: Schematische Darstellung der amino- (APTES) oder thiofunktionierten (MPS) Calciumphosphat-Nanopartikel.

Das Silanende des APTES- oder MPS-Moleküls bindet an die Silanolgruppen der SiO_2 -modifizierten Nanopartikel, was wiederum die Funktionalisierung der Oberfläche der Partikel mit Amino- oder Thiolgruppen ermöglicht.

Die kolloidchemischen Eigenschaften der funktionalisierten Nanopartikel wurden mittels DLS und REM untersucht (Tabelle 2).

Tabelle 2: Kolloidchemische Parameter der amino- oder thiofunktionierten Calciumphosphat-Nanopartikel.

Probe	Durchmesser in nm (DLS)	PDI	Zetapotential in mV	Durchmesser in nm (REM)
$\text{CaP/PEI/SiO}_2\text{-NH}_2$	160	0,15	$+23 \pm 7$	70-120
$\text{CaP/PEI/SiO}_2\text{-SH}$	193	0,23	$+26 \pm 5$	60-100

Die Polydispersitätsindizes weisen eine breitere Partikelgrößenverteilung der Partikel nach der Funktionalisierung mit Amino- oder Thiolgruppen auf. Repräsentative Größenbestimmungen der synthetisierten Nanopartikel sind in Abbildung 15 gezeigt.

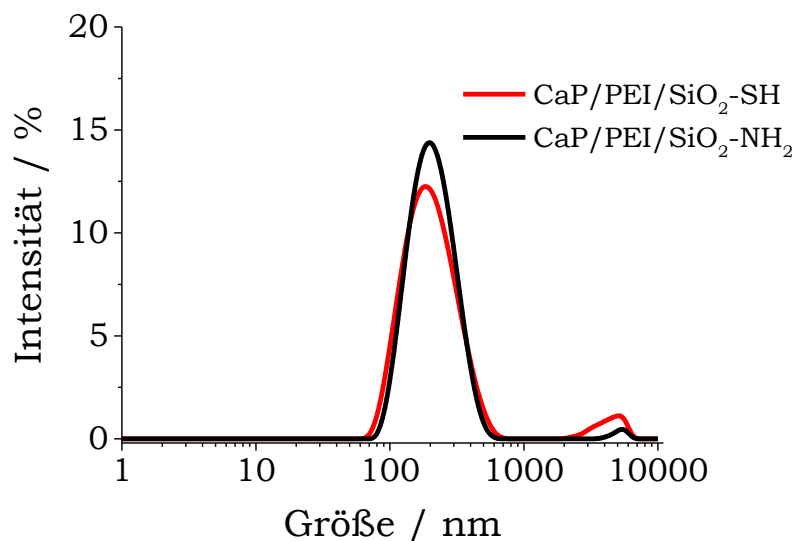


Abb. 15: Partikelgrößenverteilung (DLS) der amino- und thiofunktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikel.

In REM-Aufnahmen der funktionalisierten Nanopartikel (Abb. 16) sind sphärische Nanopartikel zu erkennen. Auf den Aufnahmen sind deutlich die Partikel der heterogenen Größenverteilung zu sehen, was gut die mittels DLS erhaltenen Partikelgrößen bestätigt.

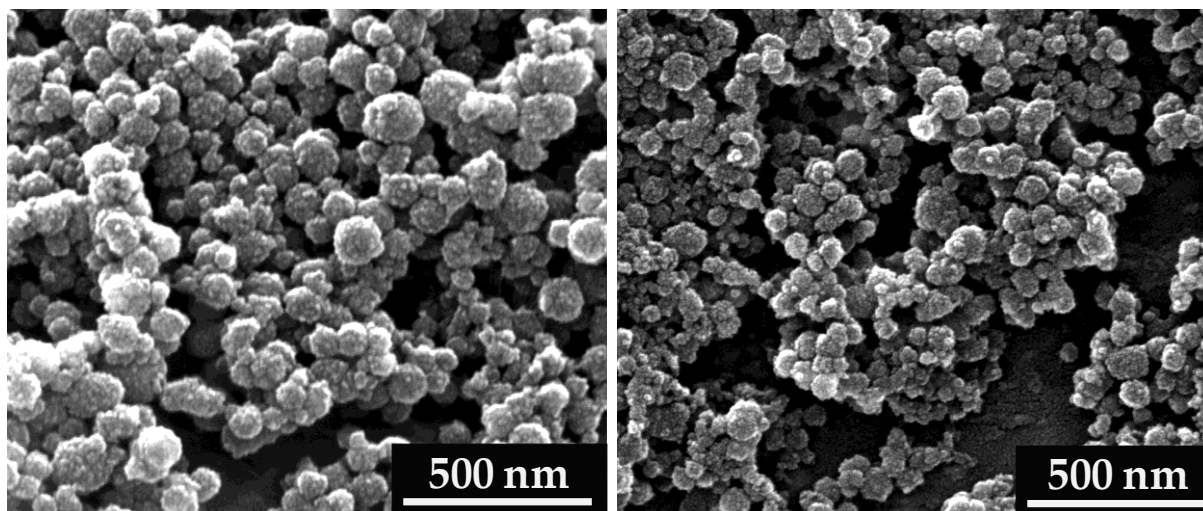


Abb. 16: REM-Aufnahmen der amino- (*links*) und thiofunktionalisierten (*rechts*) Calciumphosphat-Nanopartikel.

Die mittels AAS ermittelte Konzentration von Ca^{2+} in thiofunktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln beträgt $74 \mu\text{g mL}^{-1}$ im Pellet nach der Zentrifugation der Partikel, entsprechend $186 \mu\text{g mL}^{-1}$ Calciumphosphat in

der Dispersion (bezogen auf stöchiometrischen Hydroxylapatit, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$).

Die weitere Anwendung der modifizierten Calciumphosphat-Nanopartikel ist von der kolloidalen Stabilität der Partikel abhängig. Die Agglomeration der beiden Partikelarten wurde in Wasser mittels DLS untersucht. Die hydrodynamischen Durchmesser und die Polydispersitätsindizes wurden in regelmäßigen Abständen gemessen. Die erhaltenen hydrodynamischen Durchmesser und Polydispersitätsindizes sind in Abbildung 17 aufgetragen.

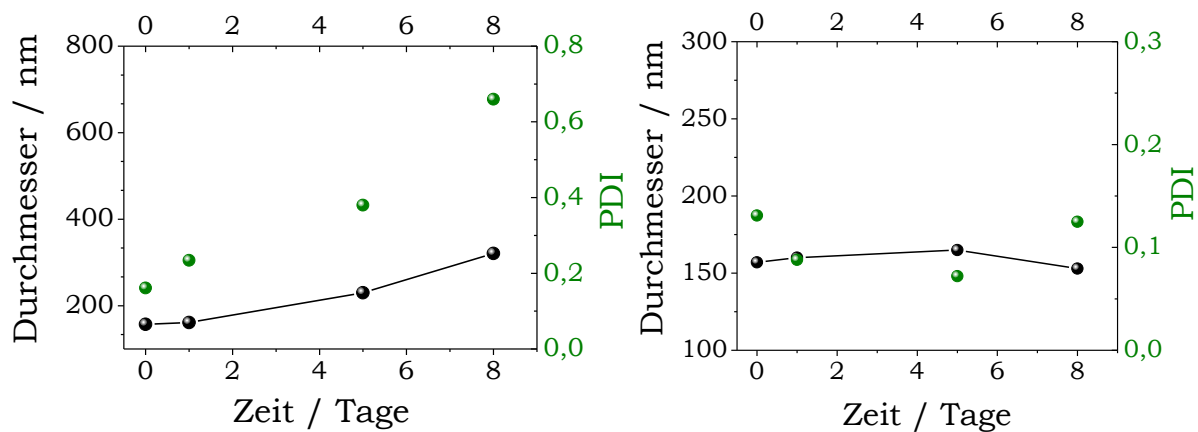


Abb.17: Agglomerationsuntersuchungen der amino- (*links*) und thiolfunktionalisierten (*rechts*) Calciumphosphat-Nanopartikel in Wasser in Abhängigkeit von der Zeit.

Die Messdaten ergeben ein stabiles System während einer Woche. Danach zeigen die hydrodynamischen Durchmesser eine tendenzielle Steigerung der Messwerte, die zu der Agglomeration der Partikel führt. Die kolloidale Stabilität einer Dispersion von Nanopartikeln ist eine wichtige Frage, um die Eigenschaften des Zielsystems zu erreichen.

Für die Anwendung der modifizierten Nanopartikel als potentiell Träger-system besteht der Bedarf der Visualisierung von Nanopartikeln. Dies ist durch die Stabilisierung der Calciumphosphat-Nanopartikel mit markiertem PEI möglich. Da für die biologischen Fragestellungen nicht alle Farbstoffe geeignet sind, wurden PEI-Fluorescein und PEI-Cy5 (Cyanin-Farbstoff) zur Stabilisierung der Partikel ausgewählt. Die Synthese der fluoreszierenden Nanopartikel wurde mit thiolfunktionalisierten Nanopartikeln durchgeführt. Partikelgrößenverteilung und Morphologie der erhaltenen fluoreszierenden

Partikel sind vergleichbar mit thiofunktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln ohne Farbstoff und werden nicht noch einmal gezeigt.

Für die Bestimmung der PEI-Menge nach der Funktionalisierung der Calciumphosphat-Nanopartikel wurde die an den Nanopartikeln adsorbierte Menge von PEI-Fluorescein spektroskopisch bestimmt.

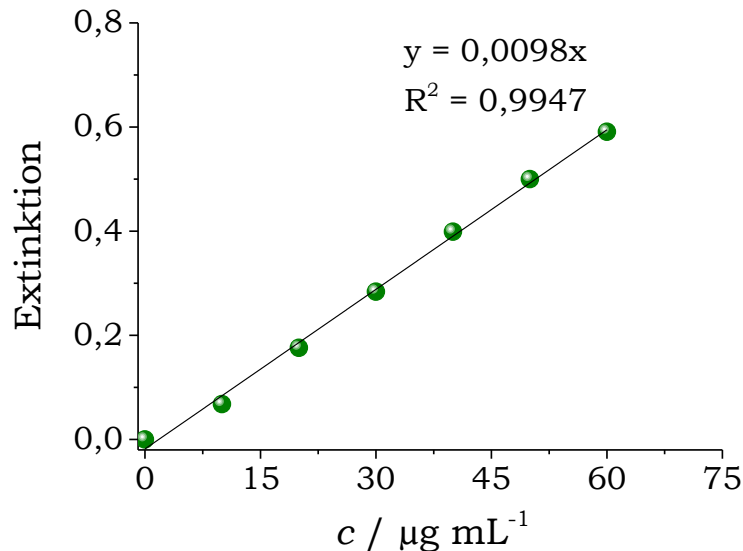


Abb. 18: Kalibrationsgerade von PEI-Fluorescein für Bestimmung der PEI-Menge nach der Funktionalisierung der Calciumphosphat-Nanopartikel mit Thiolgruppen. Die Extinktion wurde bei der Wellenlänge von $\lambda = 495 \text{ nm}$ als Funktion der Konzentration aufgetragen ($\text{pH} = 8,5$).

Die PEI-Quantifizierung der thiofunktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikel erfolgte mittels UV-Vis-Spektroskopie und einer geeigneten Kalibrationsgerade (Abb. 18). Die praktisch bestimmte Konzentration von PEI-Fluorescein nach der Partikelsynthese beträgt $57,8 \mu\text{g mL}^{-1}$, entsprechend einer Molarität von $2,3 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ($M_w = 25,0 \text{ kg mol}^{-1}$ von PEI-Fluorescein). Die Calciumphosphat-Konzentration der fluoreszierenden Nanopartikel wurde gemäß der Konzentration von nicht fluoreszierenden Partikeln angenommen ($186 \mu\text{g mL}^{-1}$ Calciumphosphat in der Dispersion). Die Berechnungen der Partikelkonzentration unter Annahme eines mittleren Radius von $r(\text{NP}) = 60 \cdot 10^{-9} \text{ m}$ ergeben, dass nach der Synthese 1 mL Dispersion $6,5 \cdot 10^{10}$ Calciumphosphat-Nanopartikel enthält und jedes Partikel mit ca. 21300 PEI-Fluorescein-Molekülen stabilisiert ist.

Zur Untersuchung der zellulären Aufnahme der fluoreszierenden Nanopartikel wurde eine fluoreszenzmikroskopische Analyse durchgeführt. Auch die Anwesenheit extrazellulärer Partikelaggregate wurde überprüft.

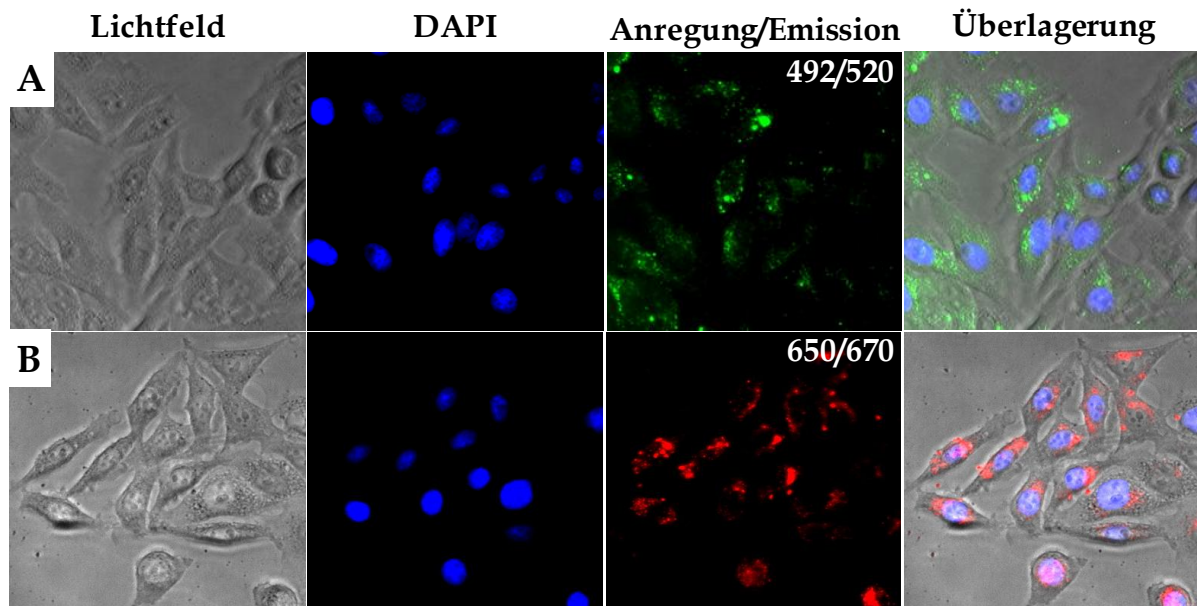


Abb. 19: Durchlicht- und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der HeLa-Zellen nach 5 Stunden Inkubation mit PEI-Fluorescein- (A) oder PEI-Cy5- (B) stabilisierten thiofunktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln. Die gegebene Partikelkonzentration beträgt $4,8 \cdot 10^9$ Nanopartikel pro $5 \cdot 10^4$ Zellen, was einer durchschnittlichen Anzahl von $9,7 \cdot 10^4$ Nanopartikeln pro Zelle entspricht.

Dazu wurden HeLa-Zellen 5 Stunden mit PEI-Fluorescein- oder PEI-Cy5-stabilisierten thiofunktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln inkubiert und anschließend unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet (Abb. 19). Zur Visualisierung der Zellen wurden die Zellkerne mit dem blau fluoreszierenden Farbstoff DAPI angefärbt. Bei der Auswertung der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen kann fein verteilte grüne (PEI-Fluorescein-stabilisierte Partikel) oder rote (PEI-Cy5-stabilisierte Partikel) Fluoreszenz der Nanopartikel nahe der Zellkerne beobachtet werden. Somit lassen sich die Silica-funktionalisierten fluoreszierenden Nanopartikel *in vitro* verfolgen und werden gut von den Zellen aufgenommen.

3.2 Konjugation der Nanopartikel mit Farbstoffen

Die aminofunktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikel wurden in dieser Arbeit für die Konjugation mit Farbstoffen entwickelt. Je nach Anwendung wurden unterschiedliche Farbstoffe kovalent an die Nanopartikel angebunden.

3.2.1 Konjugation mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC)

Die aminofunktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikel wurden mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC) kovalent konjugiert.^{54, 66} Der fluoreszierende Farbstoff FITC wird oft in den laserinduzierten fluoreszenzdetektierenden Techniken und Durchflusszytometrie (FACS) verwendet. Die Emissionsintensität des Farbstoffs ist sehr stark vom pH-Wert abhängig. Die Fluoreszenzintensität vergrößert sich im Bereich von pH 5 bis pH 8. In normalem Gewebe und Blutstrom liegt der pH bei 7,4, und die entsprechende Fluoreszenzintensität von FITC ist hoch. In Tumoren oder in entzündeten Gewebeteilen ist der pH-Wert wegen der hypoxischen Bedingungen leicht sauer (pH ~6,5), und die Fluoreszenzintensität des Farbstoffs ist niedrig.⁶⁷ Diese Eigenschaften und die leichten Konjugationsmöglichkeiten mit Aminogruppen machen FITC zu einem der am häufigsten verwendeten Farbstoffe. Die Beschichtung der Calciumphosphat-Nanopartikel mit einer Silica-Schicht und die nachfolgende Funktionalisierung mit Aminogruppen ist nicht nur für die Konjugation mit dem Farbstoff nötig, sondern auch für die Verbesserung der kolloidalen Stabilität der Partikel in wässrigen Medien und die Bildung einer inerten und biokompatiblen Schutzschicht. Die schematische Darstellung der Konjugationsreaktion von FITC mit den aminofunktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln ist in Abbildung 20 gezeigt.

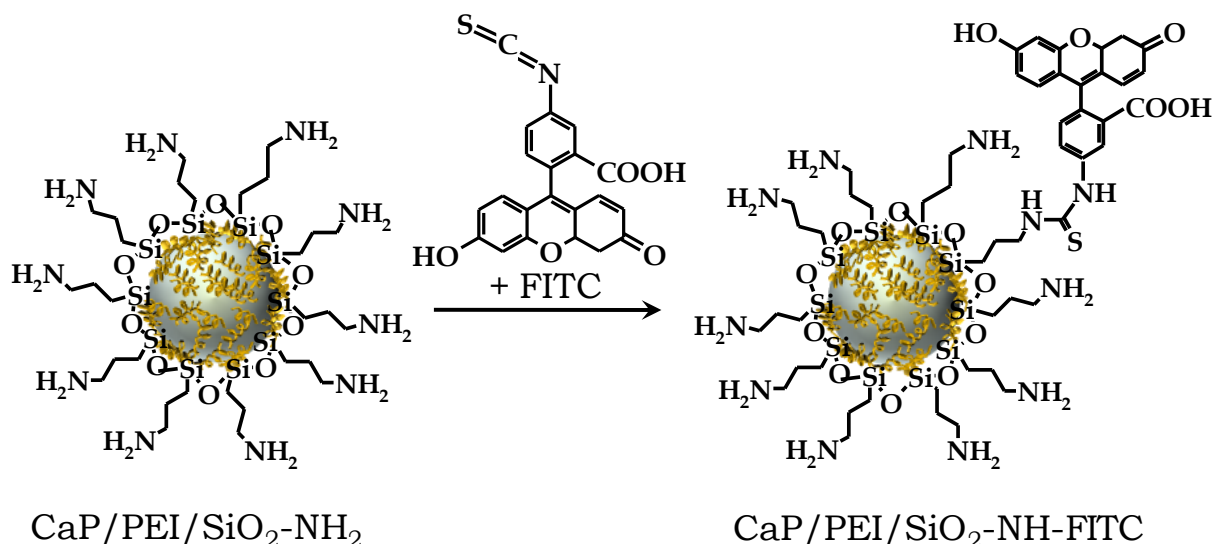


Abb. 20: Konjugationsschema der aminofunktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikel mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC).

Die Konjugationsreaktion des FITC-Moleküls mit aminofunktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln verläuft zwischen der Isothiocyanatgruppe des Farbstoffs und der Aminogruppe auf der Oberfläche der Nanopartikel.⁵⁴ Nach der Synthese wurden die kolloidchemischen Eigenschaften der erhaltenen FITC-konjugierten Nanopartikel mittels DLS und REM untersucht. Die ergebnen Messwerte sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

Tabelle 3: Kolloidchemische Parameter der FITC-konjugierten Calciumphosphat-Nanopartikel.

Probe	Durchmesser in nm (DLS)	PDI	Zetapotential in mV	Durchmesser in nm (REM)
CaP/PEI/SiO ₂ -NH-FITC	160	0,25	+15±9	50-120

Der hydrodynamische Durchmesser der FITC-konjugierten Calciumphosphat-Nanopartikel liegt bei 160 nm mit einem Polydispersitätsindex von 0,25, der noch auf einen monodispersen Charakter des erhaltenen Systems hindeutet. In Abbildung 21 ist die Partikelgrößenverteilung der fluoreszierenden Nanopartikel dargestellt.

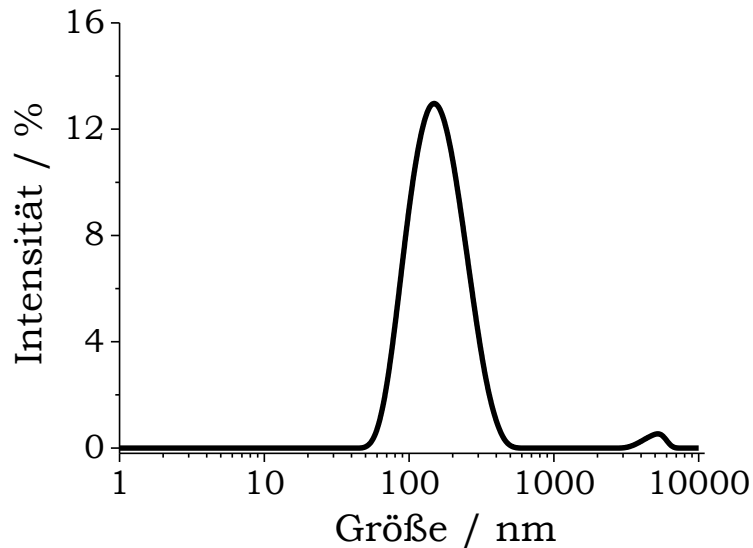


Abb. 21: Partikelgrößenverteilung (DLS) der FITC-konjugierten Silica-modifizierten Calciumphosphat-Nanopartikel.

Die REM-Aufnahme zeigt die sphärischen Nanopartikel (Abb. 22). Im Vergleich zu den Silica-modifizierten Partikeln liegen die FITC-konjugierten Calciumphosphat-Nanopartikel nicht mehr als einzelne separate Teilchen vor, vielmehr ist eine gewisse Tendenz zur Agglomeration zu erkennen.

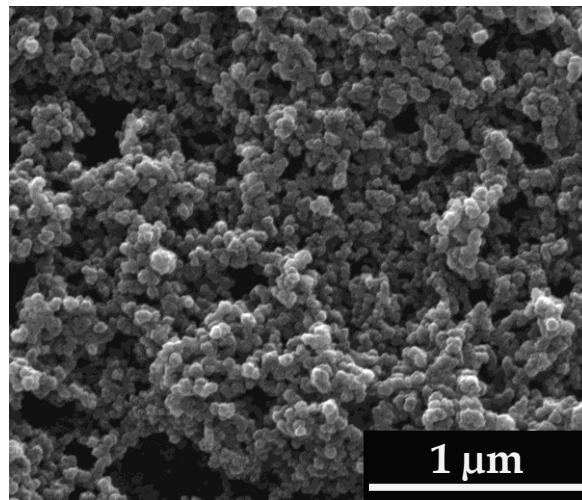


Abb. 22: REM-Aufnahme der FITC-konjugierten Calciumphosphat-Nanopartikel.

Die FITC-Konjugationsreaktion mit Aminogruppen der Nanopartikel führt zu einer stabilen Thioharnstoffbindung.^{67, 68} Die neugebildete Bindung wurde mittels UV-Vis-Spektroskopie nachgewiesen. Das Absorptionsspektrum der FITC-konjugierten Nanopartikel im Wasser bei pH 7,5 ist in Abbildung 23

gezeigt. Die Farbstoff-gekoppelten Nanopartikel zeigen ein Absorptionsmaximum bei etwa 498 nm. Das Absorptionsmaximum des reinen Farbstoffs liegt bei etwa 495 nm (pH 8,0). Die wässrige Dispersion der Calciumphosphat-Nanopartikel ohne FITC weist keine Fluoreszenz oder Absorption in dem sichtbaren Bereich auf.

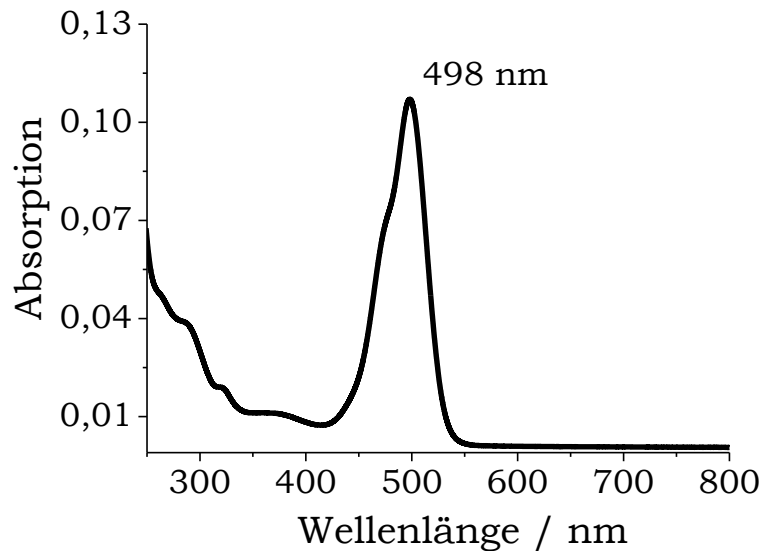


Abb. 23: UV-Vis-Spektrum der wässrigen Dispersion von FITC-konjugierten Calciumphosphat-Nanopartikeln bei pH 7,5.

Die Kenntnis über die Aufnahme der FITC-konjugierten Calciumphosphat-Nanopartikel als ein kolloidales Trägersystem in unterschiedlichen Geweben und Zelltypen ist von großer Bedeutung für ihre Anwendbarkeit sowohl *in vitro* als auch *in vivo*. Für die durchgeführten Zelluntersuchungen wurden HeLa-Zellen verwendet. Diese Zellen sind die menschliche Epithelzellen eines Zervixkarzinoms. Es handelt sich um adhärente Zellen mit hoher Teilungsrate, welche durch die Ausbildung einer Zellmonolage eine gute Basis für fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen bilden.

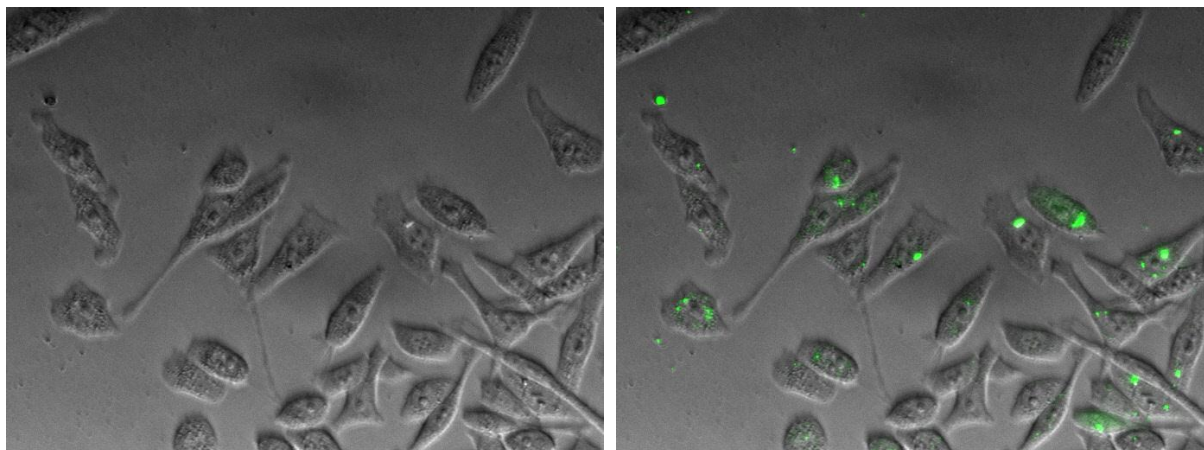


Abb. 24: Lichtmikroskopische Aufnahme (*links*) und Überlagerung (*rechts*) der HeLa-Zellen nach 5 Stunden Inkubation mit FITC-konjugierten Calciumphosphat-Nanopartikeln. Die gegebene Partikelkonzentration beträgt $5,4 \cdot 10^9$ Nanopartikel pro $5 \cdot 10^4$ Zellen, was einer durchschnittlichen Anzahl von $1,1 \cdot 10^5$ Nanopartikeln pro Zelle entspricht.

Die mikroskopischen Aufnahmen der durchgeführten Zelluntersuchungen sind in Abbildung 24 gezeigt. Nach 5 Stunden Inkubation der HeLa-Zellen mit den FITC-konjugierten Nanopartikeln ist die Verteilung der fluoreszierenden Partikel auf der Zelloberfläche zu erkennen. Wegen der begrenzten Vergrößerung ist es nicht möglich zu entscheiden, ob sich die Partikel außerhalb oder innerhalb der Zellen befinden. Sokolova *et al.* 2012 konnten mittels CLSM-Untersuchungen (konfokale Laser-Scanning Mikroskopie) den zellulären Aufnahmeweg ähnlicher Calciumphosphat-Nanopartikel zeigen und die Partikel nach 3 Stunden Inkubation in den Zellen wiederfinden.⁶⁹

Diese Zellexperimente wurden von Frau M.Sc. S. Chernousova, Anorganische Chemie, Universität Duisburg-Essen, durchgeführt.

Berechnung der FITC-Molekülzahl pro Calciumphosphat-Nanopartikel

Für die Zelluntersuchungen ist sehr wichtig, nicht nur die zu den Zellen gegebene Calciumphosphat-Menge anzugeben, sondern auch die Konzentration der Calciumphosphat-Nanopartikel pro zugegebenem Volumen. Diese Werte ermöglichen den Vergleich der Zellexperimente.

Für die Berechnungen wurde angenommen, dass stöchiometrischer Hydroxylapatit ($\text{Ca/P} = 1,67$) entsteht. Die Calciumphosphat-Menge wird über den Ca-Gehalt in den Nanopartikeln berechnet. Die Masse eines Calciumphosphat-Nanopartikels wird nach Gleichung 1 berechnet. Entsprechend der REM-Aufnahme wird der mittlere Radius eines Nanopartikels mit $r(\text{NP}) = 60 \cdot 10^{-9} \text{ m}$ angenommen.

$$N(\text{NP}) = \frac{m(\text{CaP})}{m(\text{NP})} = \frac{3 \cdot m(\text{CaP})}{4 \cdot \pi \cdot r(\text{NP})^3 \cdot \rho(\text{CaP})} \quad (1)$$

$m(\text{CaP})$ – Masse der synthetisierten Calciumphosphat-Nanopartikel in 1 m^3 Volumen ($m(\text{CaP/PEI/SiO}_2\text{-NH-FITC}) = 0,210 \text{ kg m}^{-3}$);

$m(\text{NP})$ – Masse von einem Calciumphosphat-Nanopartikel ($m(\text{NP}) = 2,84 \cdot 10^{-18} \text{ kg}$);

$\rho(\text{CaP})$ – Dichte des Calciumphosphats ($\rho(\text{Hydroxylapatit}) = 3140 \text{ kg m}^{-3}$).

Zur Bestimmung der Effizienz der Konjugation wurde die gekoppelte Menge von FITC spektroskopisch bestimmt.⁵⁴

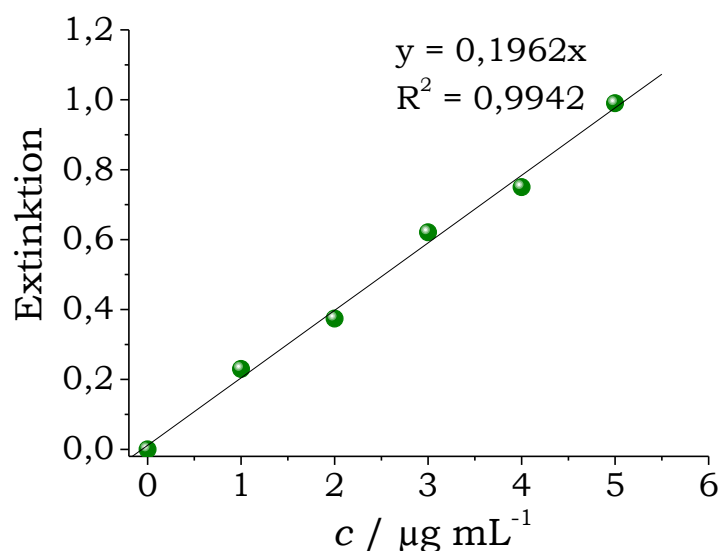


Abb. 25: Kalibrationsgerade von FITC für die Berechnung der konjugierten FITC-Moleküle an den Calciumphosphat-Nanopartikeln. Die Extinktion wurde bei der Wellenlänge von $\lambda = 495 \text{ nm}$ als Funktion der Konzentration aufgetragen ($\text{pH} = 7,5$).

Die Farbstoff-Quantifizierung der FITC-konjugierten Nanopartikel erfolgte mittels UV-Vis-Spektroskopie und einer geeigneten Kalibrationsgerade (Abb. 25). Die praktisch bestimmte Konzentration des Farbstoffs nach der Konjugation beträgt $6,3 \mu\text{g mL}^{-1}$, entsprechend einer Molarität von $1,6 \cdot 10^{-5} \text{ mol-L}^{-1}$ ($M_w = 0,3895 \text{ kg mol}^{-1}$). Nach Gleichung 2 wird die Zahl des FITC-Moleküles pro 1 m^3 berechnet.

$$N(\text{FITC}) = n(\text{FITC}) \cdot N_A \quad (2)$$

$N(\text{NP})$ – Nanopartikelmenge in 1 m^3 Volumen;

$N(\text{FITC})$ – FITC Molekülmenge in 1 m^3 Volumen;

$n(\text{FITC})$ – Stoffmenge von FITC in der Dispersion von Calciumphosphat-Nanopartikeln $n(\text{FITC}) = 0,016 \text{ mol}$;

N_A – Avogadro Zahl ($N_A = 6,022 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$).

Die berechneten Werte sind in Tabelle 4 zusammengefasst. Die Zahl der Calciumphosphat-Nanopartikel und des FITC-Moleküls ist pro 1 mL eingegeben.

Tabelle 4: FITC-Molekülzahl pro Calciumphosphat-Nanopartikel.

Probe	Anzahl der Nanopartikel/ mL Dispersion	Anzahl FITC / mL Dispersion	Anzahl FITC / Nanopartikel
CaP/PEI/SiO ₂ -NH-FITC	$7,3 \cdot 10^{10}$	$9,8 \cdot 10^{15}$	135000

Die Berechnungen zeigen, dass nach der Synthese 1 mL Dispersion $7,3 \cdot 10^{10}$ Calciumphosphat-Nanopartikel enthält und jedes Partikel mit ca. 135000 FITC-Molekülen gekoppelt ist.

3.2.2 Konjugation mit dem pH-sensitiven Farbstoff SNARF-1

Die Erforschung der physiologischen Mechanismen auf der molekularen Ebene und die Messung der extra- und intrazellulären pH-Werte sind wichtige Aspekte in der Biomedizin. Der intrazelluläre pH-Wert spielt eine wichtige modulierende Rolle in vielen zellulären Ereignissen, einschließlich Zellwachstum, Regulation der Calciumkonzentration, enzymatischer Aktivität, rezeptorvermittelter Signaltransduktion, Ionentransport und Endozytose. Die pH-sensitiven Fluorophore⁷⁰ wurden vielfach eingesetzt, um die Änderungen im intrazellulären pH-Wert zu kontrollieren.^{71, 72} Unter diesen pH-sensitiven Farbstoffen gibt Carboxyseminaphtho-rhodafluor-1 (SNARF-1)^{72, 73} eine deutliche Verschiebung der Fluoreszenzemission von rot nach grün, wenn der pH-Wert von neutral nach sauer verändert wird.⁷⁴ Die lokale Messung des pH-Wertes nach der Partikelaufnahme lässt die Lokalisation der Partikel innerhalb der Zelle erkennen, z.B. innerhalb eines Lysosoms mit niedrigem pH-Wert.

SNARF-1-konjugierte Calciumphosphat-Nanopartikel wurden für die Erfassung des lokalen pH-Werts um die Nanopartikel während der Aufnahme eingesetzt.⁷⁵

Eine schematische Darstellung der Konjugationsreaktion der aminofunktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikel mit dem SNARF-1-Farbstoff ist in Abbildung 26 gezeigt.

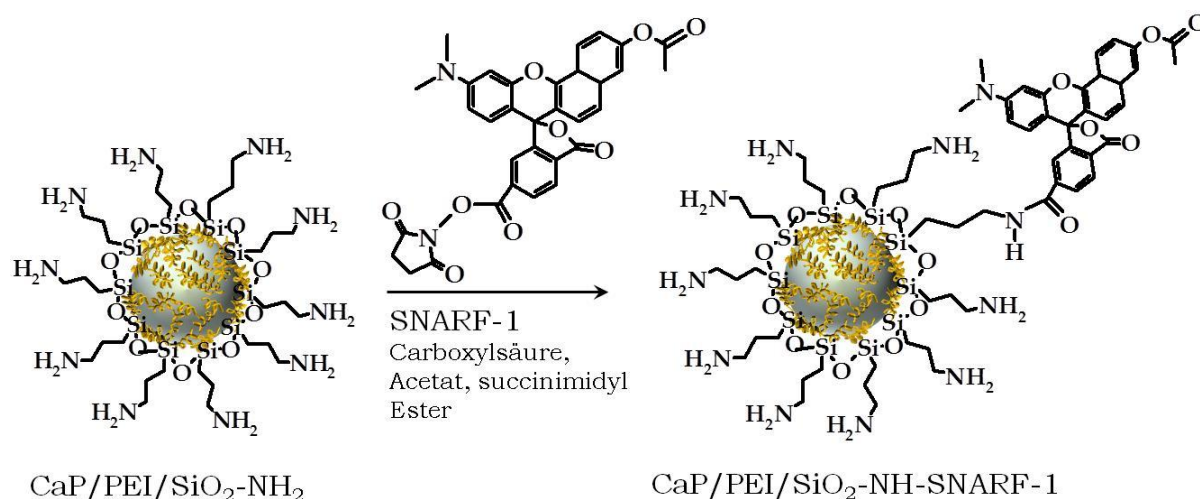


Abb. 26: Konjugation der aminofunktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikel mit dem pH-sensitiven Marker Carboxysemaphthorhodafluor-1, SNARF-1.

Die Aminogruppen auf der Oberfläche der Partikel reagieren mit dem Succinimidylester des Farbstoffs, wodurch sich die SNARF-1-konjugierten Calciumphosphat-Nanopartikel bilden.

Die SNARF-1-gekoppelten Nanopartikel wurden mittels DLS und REM untersucht. Die charakteristischen kolloidalen Eigenschaften des synthetisierten Systems sind in Tabelle 5 abgebildet.

Tabelle 5: Kolloidchemische Parameter der SNARF-1-konjugierten Calciumphosphat-Nanopartikel.

Probe	Durchmesser in nm (DLS)	PDI	Zetapotential in mV	Durchmesser in nm (REM)
CaP/PEI/SiO ₂ -NH-SNARF-1	195	0,35	+22±5	50-100

Der Polydispersitätsindex von 0,35 deutet auf ein System hin, das sich auf der Grenze zwischen monodispersen und polydispersen Charakter befindet. Die Partikelgrößenverteilung des Kolloids ist in Abbildung 27 gezeigt. Der hydrodynamische Durchmesser der SNARF-1-konjugierten Calciumphosphat-Nanopartikel liegt bei 195 nm. Die in der Dispersion teilweise agglomerierten Nanopartikel haben einen größeren Einfluss auf die

Berechnung des hydrodynamischen Durchmessers, was zu einem größeren mittleren Durchmesser führt.

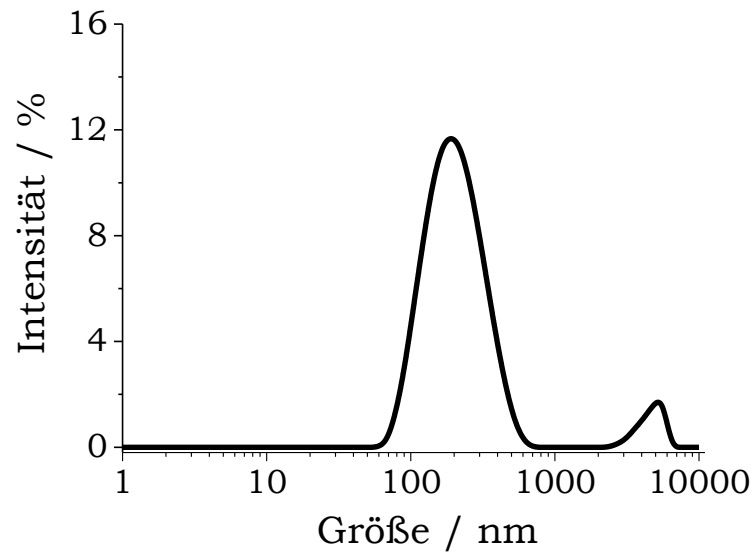


Abb. 27: Partikelgrößenverteilung (DLS) der SNARF-1-konjugierten Calciumphosphat-Nanopartikel.

Die REM-Aufnahme der hergestellten Nanopartikel ist in Abbildung 28 zu sehen. Die Calciumphosphat-Nanopartikel haben nach der Konjugationsreaktion mit dem Farbstoff eine sphärische Morphologie. In der Aufnahme sind die SNARF-1-konjugierten Nanopartikel mit dem Durchmesser zwischen 50 und 100 nm zu erkennen.

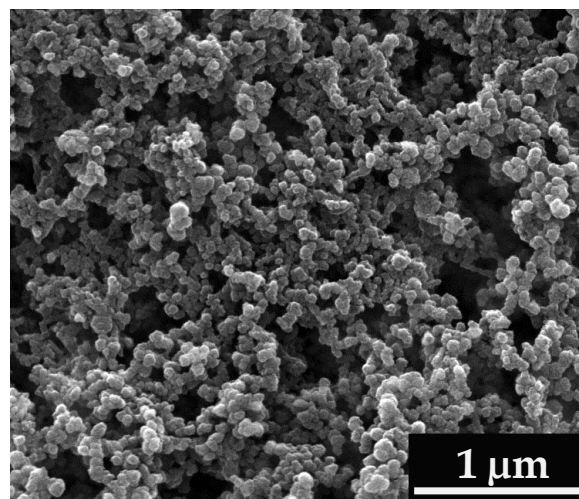


Abb. 28: REM-Aufnahme der SNARF-1-konjugierten Calciumphosphat-Nanopartikel.

Die Verschiebung der Absorptionsspektren von SNARF-1-konjugierten Nanopartikeln wurde bei verschiedenen pH-Bedingungen spektroskopisch untersucht (Abb. 29). Die Spektren wurden in einer absteigenden Reihenfolge vom pH-Wert aufgenommen. Dafür wurde der pH-Wert der Dispersion mit stark verdünnter Salzsäure jeweils um eine pH-Einheit verringert und das entsprechende Absorptionsspektrum gemessen. Das UV-Vis-Spektrum beim höchsten gemessenen pH-Wert von 9,3 zeigt ein Maximum der Absorption bei 572 nm. Das nächste Spektrum von pH 7,8 ergibt ein Maximum bei 560 nm. Bei neutralem pH-Wert von 7,1 hat das Absorptionsspektrum sein Maximum bei 554 nm. Bei einem leicht sauren pH-Wert von 5,8 sieht man ein Absorptionsmaximum bei 546 nm, und es ist auch eine Aufspaltung des Maximums zu erkennen.

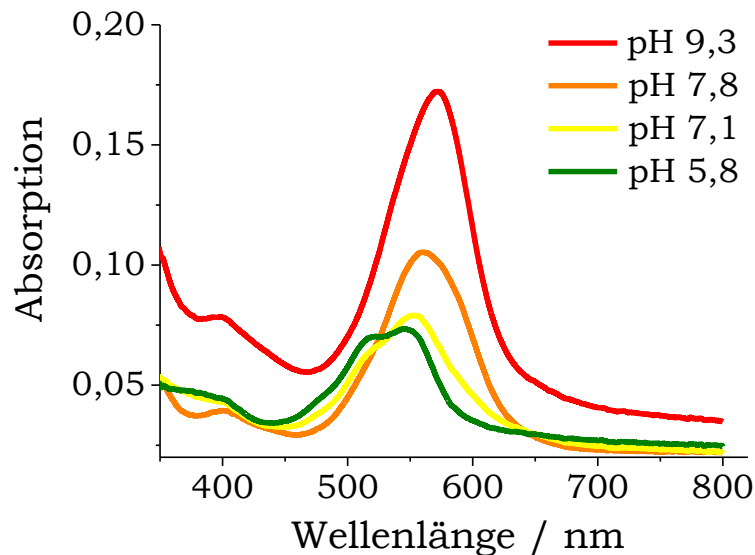


Abb. 29: UV-Vis-Spektren der Dispersion von SNARF-1-konjugierten Calciumphosphat-Nanopartikeln in Wasser bei verschiedenen pH-Werten.

Die Absorptionsspektren der Dispersion von SNARF-1-konjugierten Nanopartikeln zeigen die Eignung der Partikel für die Verwendung als lokaler pH-Sensor.^{76, 77} Die Aufnahmen der pH-Marker-konjugierten Calciumphosphat-Nanopartikel wurden auf HeLa-Zellen durchgeführt. Um die Partikel innerhalb der Zelle von auf der Zellmembran adsorbierten Partikeln zu unterscheiden, wurde die konfokale Laser-Scanning Mikroskopie (CLSM) eingesetzt. Die früheren Arbeiten von Dausend *et al.*, Fernando *et al.* und Sokolova *et al.* zeigen, dass die Partikel die Zellmembran innerhalb einer

Stunde penetrieren können.^{69, 78, 79} Für die Lokalisierung der Nanopartikel innerhalb der Zelle wurden die Lysosomen mit einem FITC-markierten Lysosomen-assoziierten Membranprotein-1 (LAMP-1)⁷⁹⁻⁸¹ gefärbt. Die Zellkerne wurden mit dem blau fluoreszierenden DNA-Farbstoff DAPI angefärbt. Die CLSM-Aufnahmen der fixierten HeLa-Zellen wurden nach 3 Stunden Inkubation mit fluoreszierenden Partikeln aufgenommen (Abb. 30). Abbildung 30A ergibt die blau angefärbten Zellkerne; 30B zeigt die grün angefärbten Lysosomen. Da die Zellen vor der LAMP-1-Färbung schon fixiert waren, fluoresziert auch das Cytoplasma und nicht nur die Lysosome. In Abbildung 30C sind rote fluoreszierende Punkte der SNARF-1-konjugierten Calciumphosphat-Nanopartikel zu sehen. Die Überlagerung (Abb. 30D) zeigt, dass die Partikel nach 3 Stunden Inkubation schon teilweise in den Lysosomen lokalisiert sind.

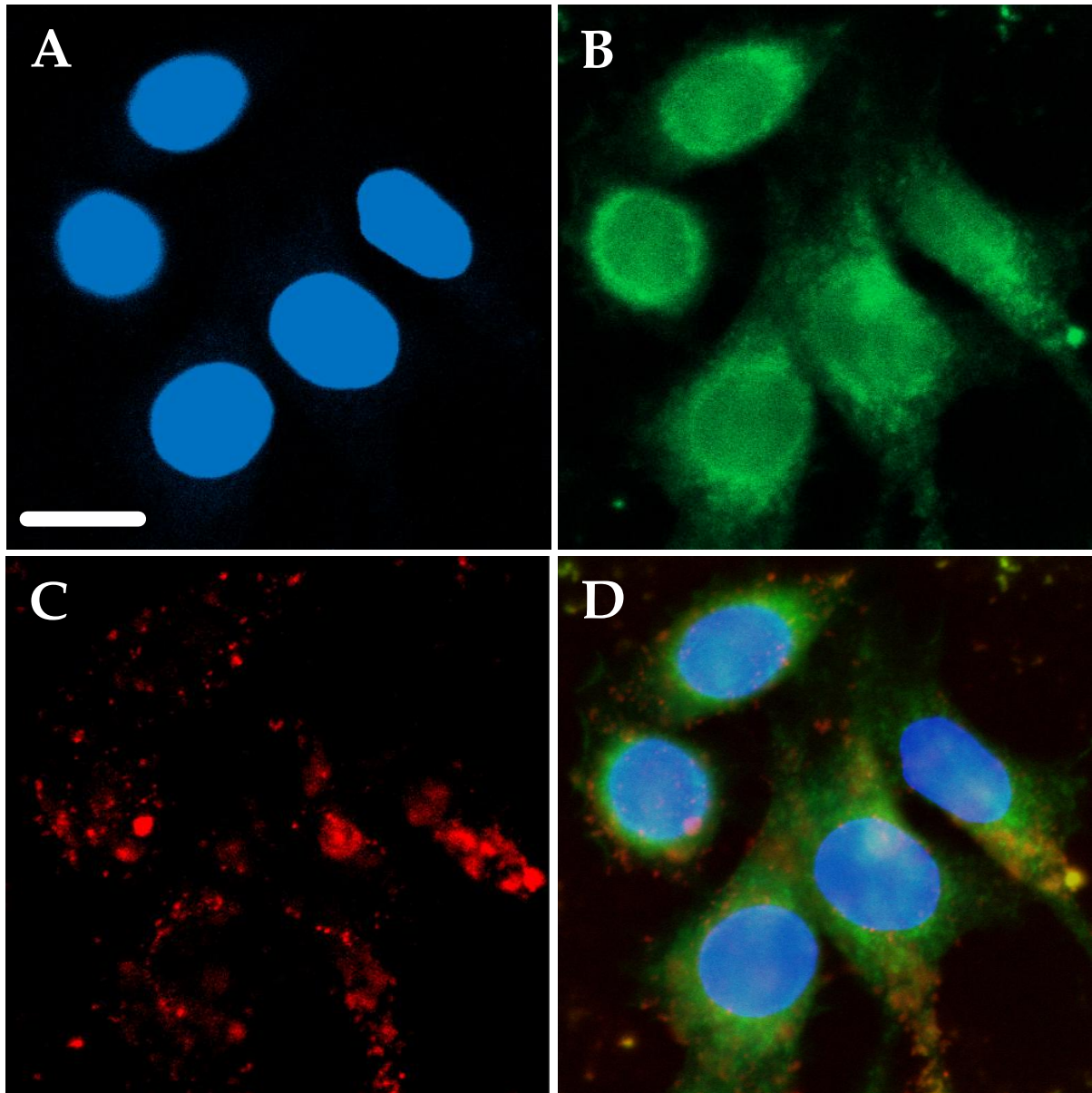


Abb. 30: CLSM-Aufnahmen der HeLa-Zellen nach 3 Stunden Inkubation mit SNARF-1-konjugierten Calciumphosphat-Nanopartikeln. **A:** blau fluoreszierende Zellkerne (DAPI-Färbung); **B:** grün fluoreszierende Lysosome (LAMP-1-Färbung); **C:** rot fluoreszierende Nanopartikel und **D:** Überlagerung der A-C Aufnahmen. Maßstab: 10 μm .

Der intrazelluläre Weg der mit dem pH-sensitiven Farbstoff SNARF-1-konjugierten Calciumphosphat-Nanopartikel wurde auf lebenden HeLa-Zellen (*semi live cell imaging*) während verschiedener Inkubationszeiten verfolgt (Abb. 31).

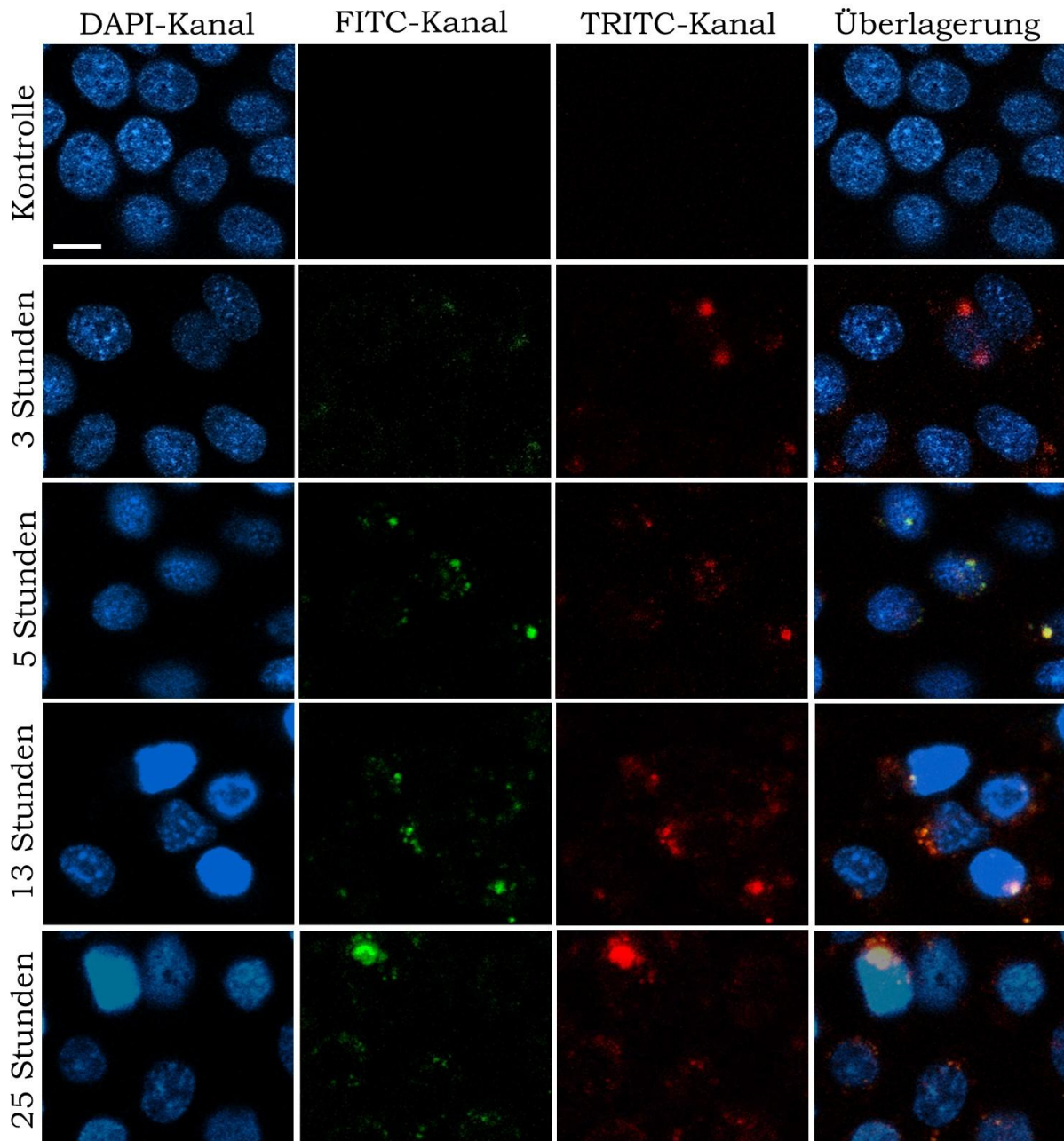


Abb. 31: CLSM-Aufnahmen der HeLa-Zellen nach den unterschiedlichen Inkubationszeiten mit SNARF-1-konjugierten Calciumphosphat-Nanopartikeln. *FITC-Kanal:* grün fluoreszierende Nanopartikel bei dem leicht sauren pH-Wert (5,0-4,5) und *TRITC-Kanal:* rot fluoreszierende Nanopartikel bei dem neutralen pH-Wert. Maßstab: 10 μm .

Der pH-Wert der verschiedenen intrazellulären Organellen variiert von pH 6,5 (frühes Endosom) bis pH 5,0-4,5 (spätes Endosom/Lysosom),⁶⁶ was zu Farbänderungen der SNARF-1-konjugierten Nanopartikel abhängig von der Lokalisierung der Partikel in der Zelle führt. Nach 3 Stunden Inkubation

sieht man eine geringe Verstärkung an der grünen Fluoreszenz im FITC-Kanal, was mit dem Eindringen der Partikel in Lysosomen erklärt werden kann. Die mit der Zeit zunehmende grüne Fluoreszenz der Partikel zeigt, dass sich mehr Partikel in den Lysosomen akkumulieren. Es ist auch zu betonen, dass die beiden Farben (grün und rot) von SNARF-1-konjugierten Nanopartikeln unter Berücksichtigung des niedrigen pH-Wertes (4,5-5,0) gleichzeitig in Endosomen/Lysosomen vorliegen. Unter diesen sauren Bedingungen können die Calciumphosphat-Nanopartikel aufgelöst werden und aus der Zelle ausgeschleust werden. Eine überschüssige Konzentration der Calciumphosphate kann aufgrund des stark erhöhten intrazellulären Calciumspiegels zur Apoptose der Zelle führen.⁸¹⁻⁸⁴

Die CLSM-Aufnahmen wurden von Frau M. Baumann, Institut für Physiologie, Universitätsklinikum Essen, AG Prof. E. Metzen, durchgeführt.

3.3 Hemmung der zellulären Aufnahme der Nanopartikel

Die zelluläre Aufnahme und der intrazelluläre Transport der Farbstoff-konjugierten Nanopartikel geben eine Vielzahl von grundlegenden Informationen über die Wechselwirkungen zwischen den Nanopartikeln und den Zellen.⁸⁵ Die fluoreszierenden Calciumphosphat-Nanopartikel wurden erfolgreich für die intrazellulären *imaging* Studien synthetisiert und mittels CLSM in HeLa-Zellen nachgewiesen. Zudem wurde die Auflösung der SNARF-1-konjugierten Calciumphosphat-Nanopartikel während der Endozytose unter den niedrigen pH-Bedingungen verfolgt (Abb. 31). Die Aufklärung der Mechanismen, mit welchen die Partikel in die Zellen aufgenommen werden, ist von großer Bedeutung für das Verständnis der potenziellen Toxizität und zur Verbesserung der Aufnahme von Nanopartikeln in einer biomedizinischen Anwendung. Die zelluläre Aufnahme kann durch verschiedene Aufnahmemechanismen aufgetreten werden.⁸¹ Auf Grund der Barrierefunktion der Zellmembran können nur kleinere Moleküle die Zellmembran passiv durchdringen, während größere Moleküle meistens nur mit einem Trägersystem in die Zelle gelangen können.^{69, 86} Diese Aufnahmemechanismen werden unter dem Begriff Endozytose zusammengefasst.⁸⁷ Die Endozytose erfolgt durch mehrere Mechanismen, die in die zwei großen Kategorien wie Phagozytose und Pinozytose eingeteilt werden kann. Mit Phagozytose bezeichnet man die Aufnahme von Partikeln bis hin zu kleineren Zellen. Die Pinozytose bezeichnet die Aufnahme von kleineren Flüssigkeitsmengen und darin gelösten Substanzen aus dem Umgebungsmedium der Zelle.

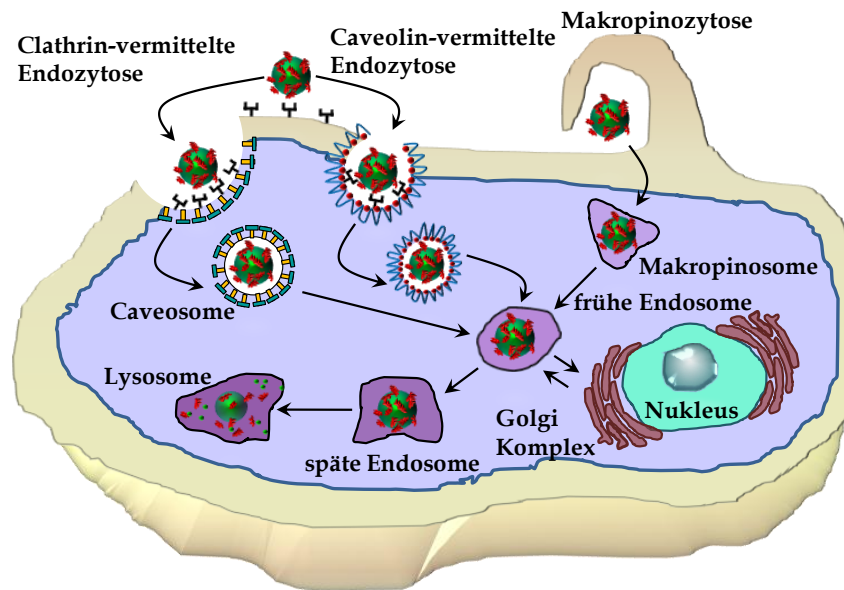


Abb. 32: Schematische Darstellung der verschiedenen Mechanismen zur Internalisierung von Nanopartikeln: Clathrin-vermittelte Endozytose, Caveolin-vermittelte Endozytose und Makropinozytose.

Die Phagozytose ist nur für manche Säugerzellen charakteristisch, während die Pinozytose in allen Zellen mindestens in vier grundlegenden Mechanismen auftritt. Man unterscheidet Makropinozytose, Clathrin-vermittelte Endozytose, Caveolin-vermittelte Endozytose, und Clathrin- und Caveolin-unabhängige Endozytose (Abb. 32).^{75, 79, 87, 88} Die Inhibitoren der Endozytose, die für die entsprechenden Mechanismen zur Internalisierung von Nanopartikeln zuständig sind, sind in Tabelle 6 zusammengefasst.

Tabelle 6: Die pharmakologischen Inhibitoren für die Untersuchungen der Endozytose.

Inhibitor	Effekt	Inhibierte endozytotische Mechanismen
Wortmannin und LY294002	Blockierung der Wirkung von Phosphoinositid-3-Kinase (ein Enzym) ^{79, 89}	Makropinozytose (Partikelgröße 1-5 µm), teilweise Clathrin-unabhängige Endozytose (Partikelgröße ~90 nm)
Nocodazol	Hemmung der Proteine des Zytoskeletts, einschließlich Aktin ⁷⁹	Makropinozytose (Partikelgröße 1-5 µm)
Chlorpromazine	Hemmung des Abbaues von Clathrin ⁹⁰	Clathrin-vermittelte Endozytose (Partikelgröße ~120 nm)
Nystatin	Wechselwirkung mit Cholesterin ⁸⁹	Caveolin-vermittelte Endozytose (Partikelgröße ~60 nm)

Das Ausmaß und die Art der Aufnahme von Nanopartikeln sind von physiko-chemischen Eigenschaften wie Partikelgröße, Ladung, Beschichtung der Oberfläche, chemischer Zusammensetzung und Hydrophilie/Hydrophobie abhängig. Außerdem hängt die Aufnahme der Partikel vom jeweiligen Zelltyp ab. Die fluoreszierenden Calciumphosphat-Nanopartikel mit annähernd kugelförmiger Morphologie und einem mittleren Durchmesser von 120 nm (Abb. 33) wurden als Modell für die Untersuchungen der Aufnahme in HeLa-Zellen ausgewählt.

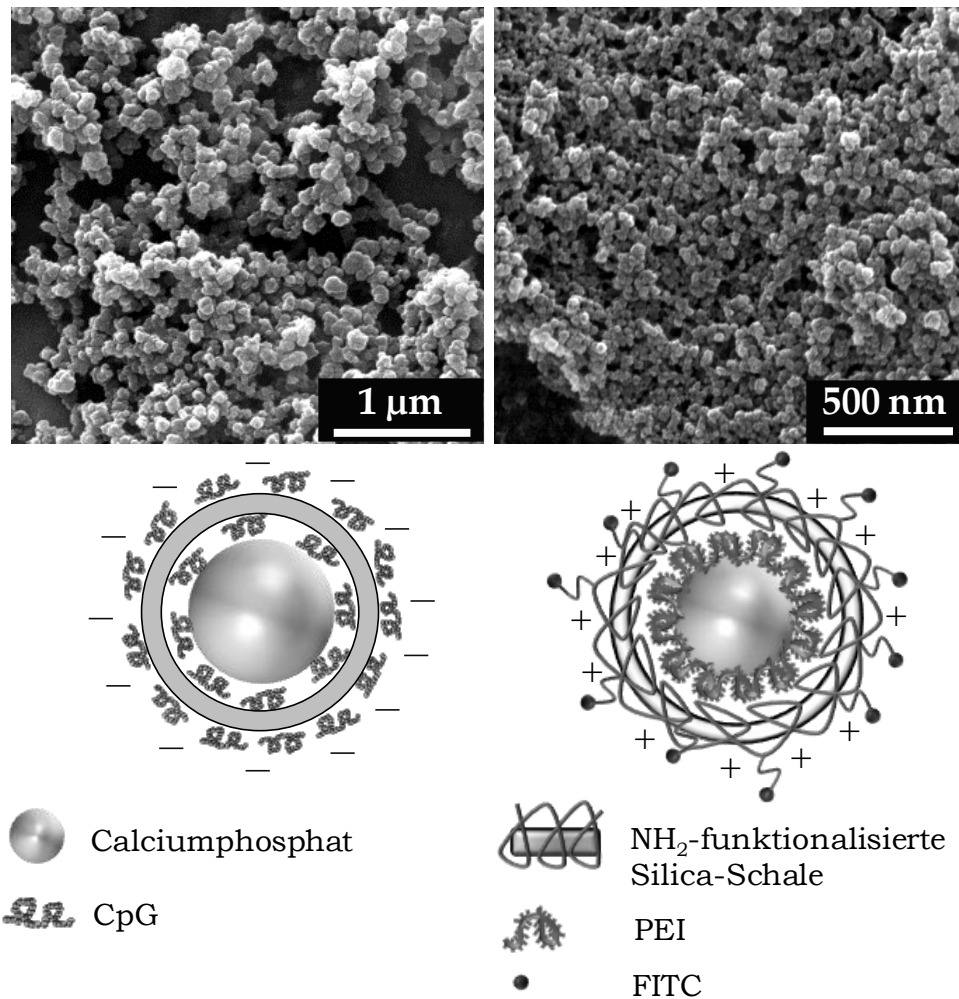


Abb. 33: REM-Aufnahmen (*oben*) und schematische Darstellung (*unten*) der funktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikel (*links*: CaP/CpG/-CaP/CpG-Alexa488 und *rechts*: CaP/PEI/SiO₂-NH-FITC). CpG: Oligonukleotid zur Stabilisierung und negativer Ladung der Nanopartikel.

Die hydrodynamischen Durchmesser der synthetisierten Nanopartikel liegen zwischen 200 nm und 300 nm, je nach Partikelart (Tabelle 7). Die Polydispersitätsindizes von 0,24-0,35 deuten auf keine starke Agglomeration der Fluoreszenz-markierten Calciumphosphat-Nanopartikel hin. Die CaP/CpG/-CaP/CpG-Alexa488-Nanopartikel haben ein Zetapotential von -25 mV, und die CaP/PEI/SiO₂-NH-FITC-Nanopartikel ein Zetapotential von +21 mV.

Tabelle 7: Kolloidchemische Parameter der fluoreszierenden Calciumphosphat-Nanopartikel für Untersuchungen der Endozytose.

Probe	Durchmesser in nm (DLS)	PDI	Zetapotential in mV
CaP/CpG/CaP/CpG-Alexa488	322	0,35	-25±4
CaP/PEI/SiO ₂ -NH-FITC	183	0,24	+21±4

Um die Aufnahmeeffizienz der Fluoreszenz-markierten Nanopartikel zu bestimmen, wurden die HeLa-Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen der Partikel inkubiert (von $2,30 \cdot 10^9$ bis $6,65 \cdot 10^9$ Nanopartikel mL^{-1} von CaP/CpG/CaP/CpG-Alexa488 und von $0,072 \cdot 10^9$ bis $1,77 \cdot 10^9$ Nanopartikel mL^{-1} von CaP/PEI/SiO₂/NH-FITC). Die resultierende Fluoreszenz pro Zelle wurde mittels Durchflusszytometrie (FACS) bestimmt. Abbildung 34 zeigt eine deutlich zunehmende mittlere Fluoreszenzintensität nach der Aufnahme mit ansteigender Konzentration beider Partikelarten.

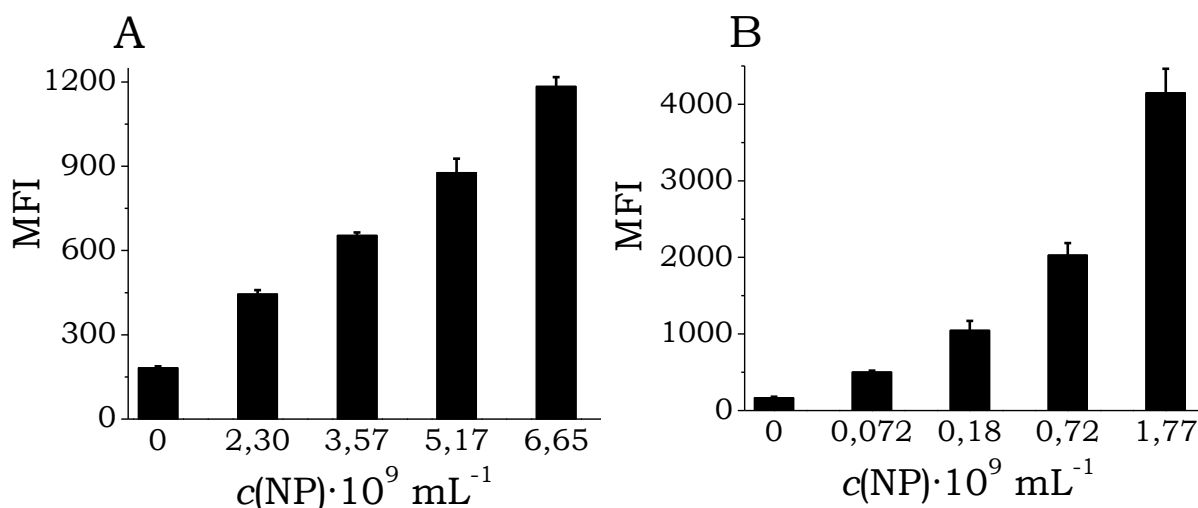


Abb. 34: FACS-Ergebnisse der HeLa-Zellen nach 3 Stunden Inkubation mit verschiedenen Konzentration der CaP/CpG/CaP/CpG-Alexa488- (A) und CaP/PEI/SiO₂-NH-FITC-Nanopartikel (B). MFI: mittlere Fluoreszenzintensität.

Die erhaltenen FACS-Ergebnisse zeigen eine effiziente Aufnahme der Partikel durch HeLa-Zellen. Desweiteren weisen die Fluoreszenz-markierten Calcium-

phosphat-Nanopartikel keine oder eine ganz geringe Toxizität auf. Die Viabilität der HeLa-Zellen nach 3 Stunden Inkubation mit ansteigender Konzentration der negativ und positiv geladenen Calciumphosphat-Nanopartikel wurde mittels MTT-Test bestimmt (Abb. 35).

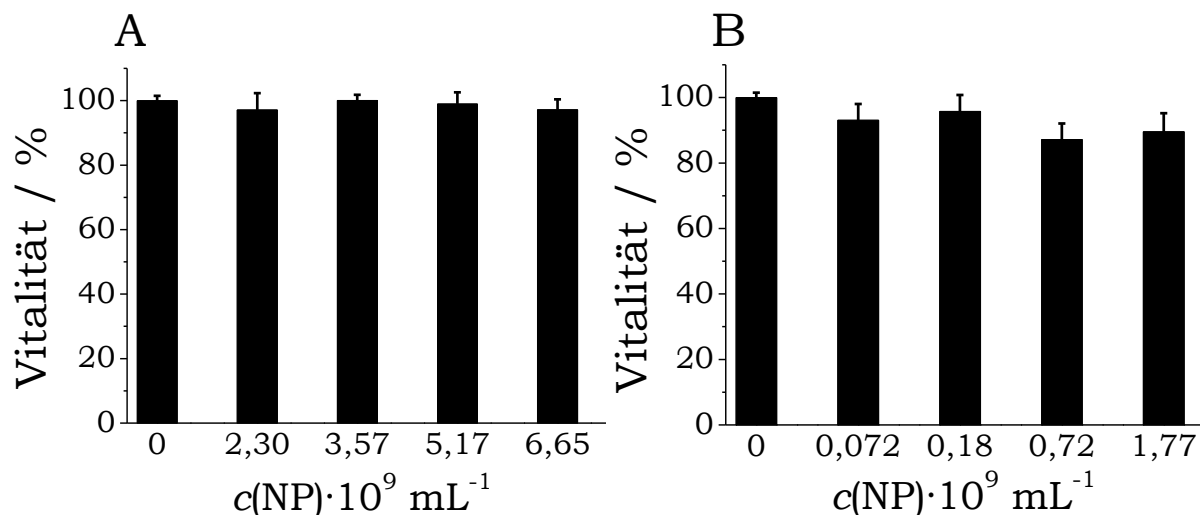


Abb. 35: MTT-Ergebnisse der HeLa-Zellen nach 3 Stunden Inkubation mit verschiedenen Konzentration der CaP/CpG/CaP/CpG-Alexa488- (A) und CaP/PEI/SiO₂-NH-FITC-Nanopartikel (B).

Der ausgewertete Toxizitätstest der beiden Partikelarten zeigt fast keine Reduktion der Zellviabilität nach der Inkubation der Zellen mit Partikeln im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Die Vitalität der Zellen beträgt bei allen getesteten Partikelkonzentrationen 90-100 %.

Der Weg der Aufnahme von Nanopartikeln in die Zelle und die nachfolgende intrazelluläre Lokalisierung sind von großer Bedeutung für die potentielle Anwendung als *gene* oder *drug delivery* System. Die Mechanismen der zellulären Aufnahme von negativ und positiv geladenen Calciumphosphat-Nanopartikeln wurden mit den verschiedenen Inhibitoren der Endozytose (Tabelle 6) untersucht. Die HeLa-Zellen wurden für 30 Minuten mit den Inhibitoren inkubiert und danach mit anionischen CaP/CpG/CaP/CpG-Alexa488- oder mit kationischen CaP/PEI/SiO₂/NH-FITC-Nanopartikeln behandelt. Die Zellen der Positivkontrolle wurden mit den Nanopartikeln in Abwesenheit von Inhibitoren inkubiert. Die Zellen der Negativkontrolle wurden mit den Nanopartikeln bei 4 °C inkubiert.⁷⁸ Da die Endozytose ein

energieabhängiger Prozess ist, wird die Partikelaufnahme bei niedrigen Temperaturen stark inhibiert.⁷⁵

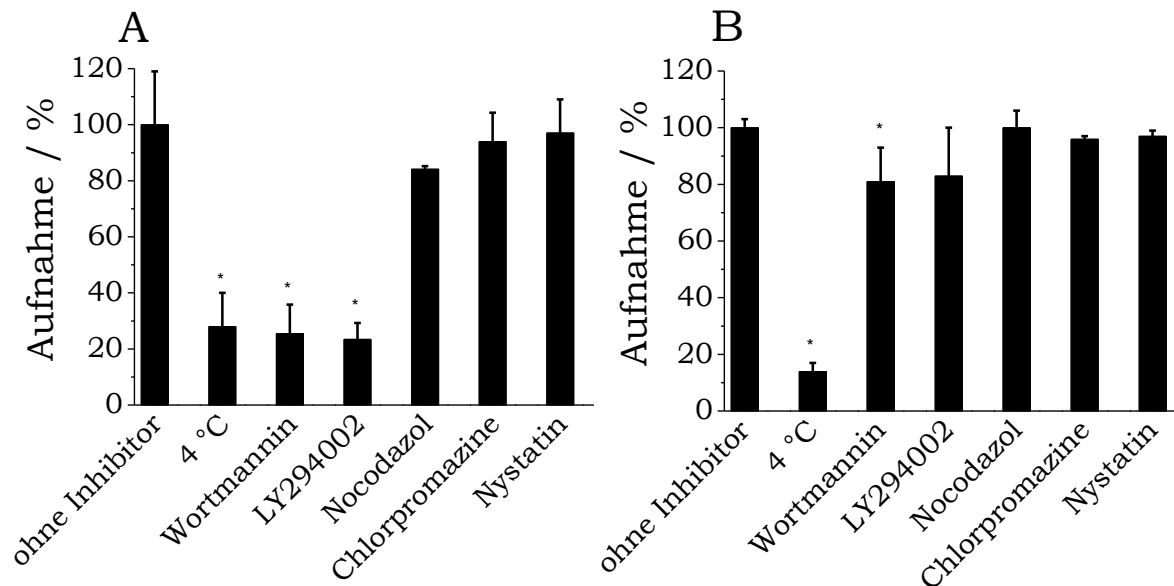


Abb. 36: Blockierung der Zellaufnahme von CaP/CpG/CaP/CpG-Alexa488- (A) und CaP/PEI/SiO₂-NH-FITC-Nanopartikeln (B) nach der Inkubation der HeLa-Zellen mit Inhibitoren der Endozytose.

Eine Abnahme der gemessenen mittleren Fluoreszenz pro Zelle im Vergleich zu der positiven Kontrolle zeigt die spezifischen Mechanismen der Endozytose, die an diesem Prozess beteiligt sind (Abb. 36). Eine statistisch signifikante Inhibition der zellulären Aufnahme von negativ geladenen Nanopartikeln wird im Fall von Wortmannin und LY294002 (Abb. 36A) beobachtet. Die Hemmung durch Wortmannin und durch LY294002 ist ein Hinweis, dass die Partikel mittels Makropinozytose in die Zelle aufgenommen werden.^{79, 89} Eine leichte Hemmung durch Nocodazol wird auch in der Aufnahme von CaP/CpG/CaP/CpG-Alexa488-Nanopartikeln erkannt. Die Aufnahme der positiv geladenen Nanopartikel wird durch Wortmannin signifikant inhibiert (Abb. 36B). Keine Inhibition der Aufnahme von beiden Partikelarten wird durch Chlorpromazin oder durch Nystatin, die die Clathrin- oder Caveolin-vermittelte Endozytose blockieren, beobachtet. Demgemäß deuten die oben diskutierten Ergebnisse auf die Aufnahme der Fluoreszenz-markierten Calciumphosphat-Nanopartikel mittels Makropinozytose hin.

Die FACS-Untersuchungen wurden von Frau Dr. V. Sokolova, Anorganische Chemie, Universität Duisburg-Essen, und Herrn Dr. T. Knuschke, Medizinische Mikrobiologie, Universitätsklinikum Essen, durchgeführt.

3.4 Anwendung der Nanopartikel für *in vivo* Bildgebung und PDT

Optical Imaging stellt einen relativ neuen Ansatz in der Diagnostik dar und beruht auf der Nutzung von Nahinfrarot (NIR)-Fluoreszenz. Farbstoffe mit einem Absorptions- und Emissionsspektrum im NIR-Bereich zwischen 700 nm und 900 nm werden für diese Methode verwendet.⁹¹ Die Besonderheit liegt darin, dass das Gewebe innerhalb dieses Wellenlängenbereiches, welcher auch als optisches Fenster bezeichnet wird, die geringste Eigenabsorption durch physiologische Komponenten wie Hämoglobin, Lipide und Wasser besitzt.⁹² Die Autofluoreszenz des Gewebes aus den endogenen Chromophoren, einschließlich struktureller Proteine (Kollagen und Elastin), Aminosäuren (Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin), Enzyme und Lipide, ist minimal.⁹³ Die häufigsten organischen NIR-Fluorophore sind Cyaninkomplexfarbstoffe, Phthalocyanine, Porphyrin-Derivate und BODIPY.^{91, 92, 94} Die Verkapselung der NIR-Farbstoffe in Nanopartikel führt zu einer intensiveren Fluoreszenz und deutlich besserer Photostabilität im Vergleich zu den reinen Fluorophoren. Eine weitere Möglichkeit zur Funktionalisierung der Farbstoffe ist die kovalente Konjugation auf der Oberfläche der Nanopartikel, was zu einem verbesserten Targeting und einer erhöhten Hydrophilie führt. Die große Oberfläche der Nanopartikel verlängert zudem die *in vivo* Umlaufzeit der NIR-Farbstoffe für die langfristige mehrfache Bildgebung.⁹¹ Zahlreiche NIR-Farbstoff-funktionalisierte Nanopartikel (Kieselsäure-Nanopartikel,⁹⁵ Liposomen,⁹⁶ Polymersomen^{97, 98} und Calciumphosphosilikat-Nanopartikel^{48, 99-101}) wurden bereits entwickelt und in der Tumordiagnostik und Behandlung angewendet.

3.4.1 DY-682-markierte Nanopartikel

Nahinfrarot-Bildgebung hat sich als leistungsfähige nicht-invasive und nicht-ionisierende Methode für die diagnostische Bildgebung des empfindlichen tiefen Gewebes bewährt. NIR-Farbstoff-verkapselte Nanopartikel auf Calciumphosphat-Basis zeigen eine verbesserte optische Leistung wie Quantenausbeute und Fluoreszenzlebensdauer durch Abschirmen der NIR-Farbstoffe vor unerwünschten Umgebungseinflüssen.^{40, 100}

Der für die Synthese ausgewählter NIR-Farbstoff DY-682 weist eine verbesserte Fluoreszenzquantenausbeute, eine gute Stabilität und eine geringe Zytotoxizität auf.¹⁰²⁻¹⁰⁴

Die Synthese und Konjugation von Calciumphosphat-Nanopartikeln mit DY-682 ist in Abbildung 37 gezeigt. Der NIR-Farbstoff wurde zwischen der Silica-Schale der modifizierten Partikel und der folgenden thiofunktionierten Schale eingebettet. Die Thiolgruppen auf der Oberfläche der Nanopartikel können in der Folge leicht mit Peptiden, Proteinen oder Antikörpern zur Verbesserung der zellspezifischen Aufnahme konjugiert werden.¹⁰⁵

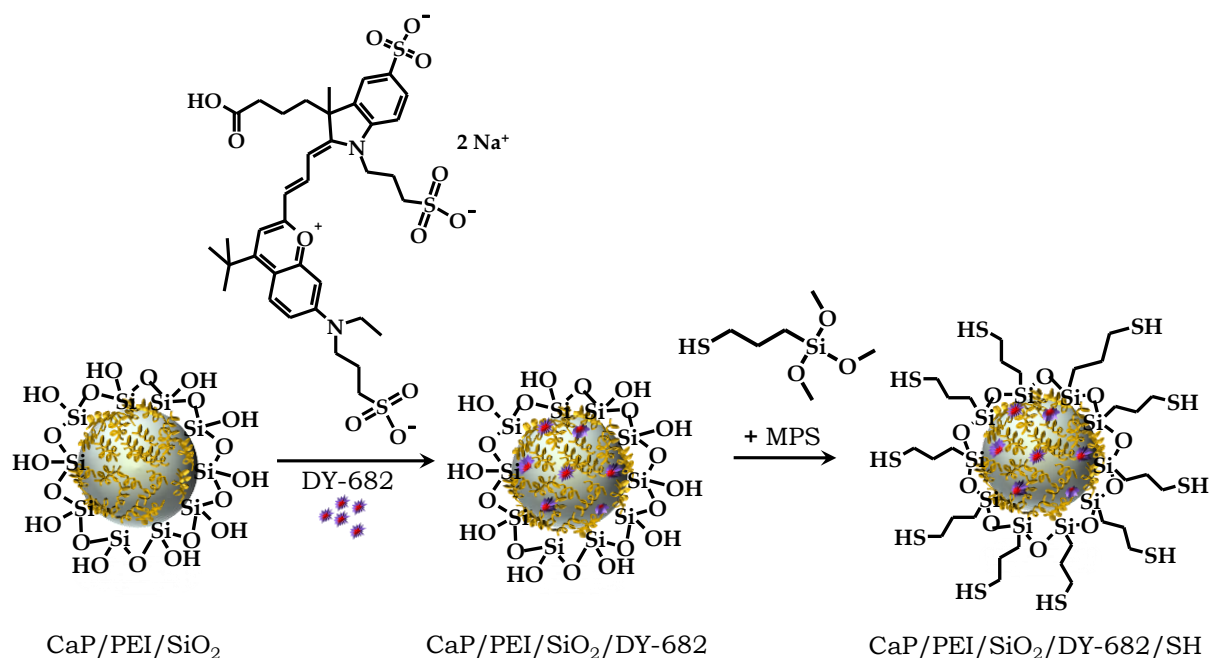


Abb. 37: Schematische Darstellung der Markierung von thiofunktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln mit DY-682.

Die DLS-Messung ergibt eine unimodale Partikelgrößenverteilung mit der maximalen prozentualen Intensität bei 170 nm (Abb. 38). Der Polydispersitätsindex von 0,182 zeigt einen monodispersen Charakter des erhaltenen Systems. Die Oberfläche der NIR-markierten Nanopartikel ist positiv geladen mit einem Zetapotential von $+23 \pm 6$ mV.

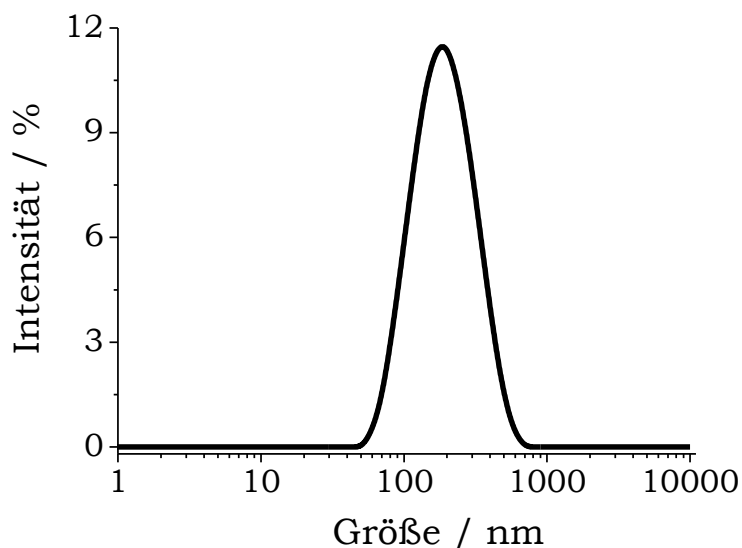


Abb. 38: Partikelgrößenverteilung (DLS) der DY-682-markierten und thiofunktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikel.

Die positive Ladung der Partikel kann man den durchdringenden Amino-
gruppen des Polymers durch die Silica-Schale zuordnen.⁵¹ Die Nanopartikel
mit solchen nanoskaligen Dimensionen können sich leichter auf Grund des
EPR-Effekts ("*erhöhte Permeabilität und Retention*") im Tumor anreichern.⁹⁸
Abbildung 39 zeigt die REM-Aufnahme der hergestellten Nanopartikel. In der
Aufnahme sind annähernd kugelförmige Nanopartikel mit einem Durch-
messer zwischen 50 und 80 nm zu erkennen.

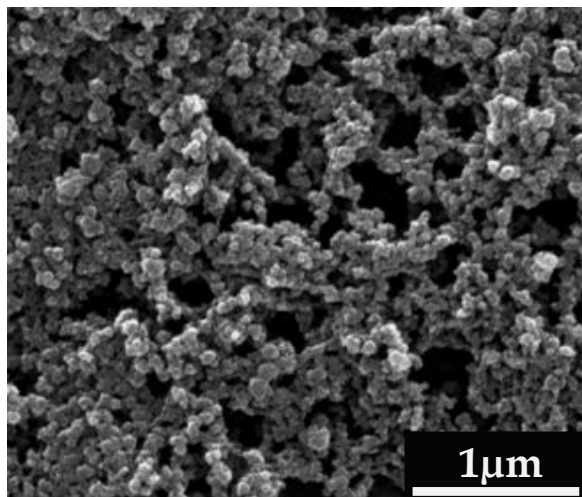


Abb. 39: REM-Aufnahme der DY-682-markierten und thiole-funktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikel.

Die photophysikalischen Eigenschaften der DY-682-markierten und thiole-funktionalisierten Nanopartikel sind in Abbildung 40 dargestellt. Die optische Absorption und das Fluoreszenzspektrum der erhaltenen Nanopartikel ergeben ein Absorptionsmaximum mit λ_{max} von 641 nm und einer Aufspaltung von 690 nm und ein Emissionsmaximum von 709 nm. Es ist keine signifikante Verschiebung der Emissionswellenlänge der DY-682-markierten Nanopartikel im Vergleich zum reinen Farbstoff (λ_{max} von 709 nm) zu sehen. Das deutet darauf hin, dass der Farbstoff nach der Synthese stabil geblieben ist. Da die Emissionswellenlänge des DY-682-Farbstoffes im NIR-Bereich liegt, stellen die markierten Nanopartikel eine Möglichkeit zur Verfolgung der Partikel *in vivo* dar.

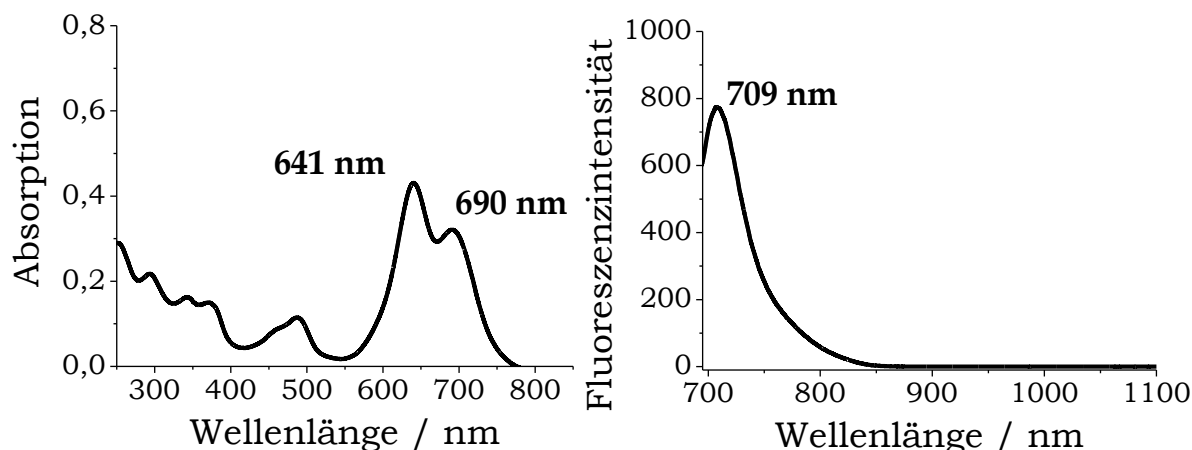


Abb. 40: UV-Vis- (links) und Fluoreszenzspektrum (rechts) der Dispersion von DY-682-markierten Calciumphosphat-Nanopartikeln in Wasser. (Verdünnung 1:4).

Für die Auswertung des Markierungsgrads wurde die gebundene Menge von DY-682 an den Nanopartikeln spektroskopisch bestimmt.

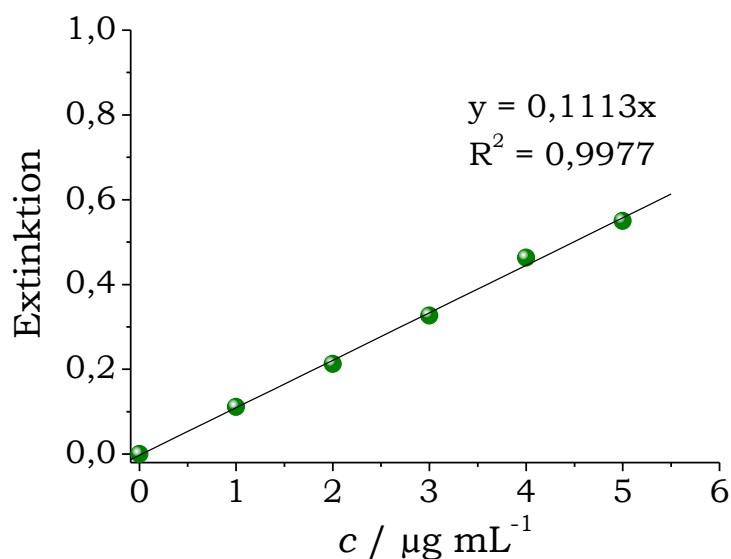


Abb. 41: Kalibrationsgerade von DY-682 für die Bestimmung der DY-682-Konzentration nach der Markierung der Calciumphosphat-Nanopartikel. Die Extinktion wurde bei der Wellenlänge von $\lambda = 677$ nm als Funktion der Konzentration aufgetragen (pH = 7,3).

Die Farbstoff-Quantifizierung der DY-682-markierten Nanopartikel erfolgte mittels UV-Vis-Spektroskopie und einer geeigneten Kalibrationsgerade (Abb. 41). Die praktisch bestimmte Konzentration des Farbstoffs nach der Markierung beträgt $5,6 \mu\text{g mL}^{-1}$, die berechnete Molarität $5,9 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$.

($M_w = 0,95003 \text{ kg mol}^{-1}$ von DY-682). Die mittels AAS ermittelte Konzentration von Ca^{2+} beträgt $88 \mu\text{g mL}^{-1}$ im Pellet nach der Zentrifugation der Partikel, entsprechend $221 \mu\text{g mL}^{-1}$ Calciumphosphat in der Dispersion (bezogen auf stöchiometrischen Hydroxylapatit, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$). Die Berechnungen der Partikelkonzentration unter Annahme eines mittleren Radius von $r(\text{NP}) = 35 \cdot 10^{-9} \text{ m}$ ergeben, dass nach der Synthese 1 mL Dispersion $3,9 \cdot 10^{11}$ Calciumphosphat-Nanopartikel enthält und jedes Partikel mit ca. 8000 DY-682-Molekülen markiert ist.

Die zelluläre Aufnahme der DY-682-markierten Nanopartikel wurde mit den HeLa-Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht (Abb. 42). Die Zellkerne wurden mit DAPI markiert (Abb. 42A). Das Aktin-Zytoskelett der Zellen wurde grün angefärbt (Abb. 42B). Die Fluoreszenz der Partikel in den Zellen ist in Abbildung 42C zu sehen. In der Überlagerung ist eine gleichmäßige Verteilung der punkartigen rot fluoreszierenden Nanopartikel um die Zellkerne deutlich zu beobachten (Abb. 42D).

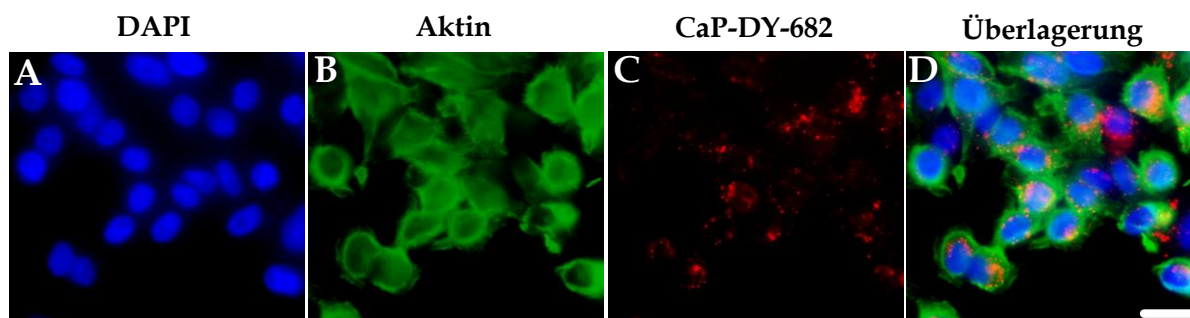


Abb. 42: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der HeLa-Zellen nach 7 Stunden Inkubation mit DY-682-markierten Calciumphosphat-Nanopartikeln. A: DAPI-Färbung; B: Aktin-Färbung; C: DY-682-Farbstoff-markierte Nanopartikel und D: Überlagerung der A-C Aufnahmen. Die gegebene Partikelkonzentration beträgt $3,1 \cdot 10^{10}$ Nanopartikel pro 10^5 Zellen, was einer durchschnittlichen Anzahl von $3,1 \cdot 10^5$ Nanopartikeln pro Zelle entspricht. Maßstab: $20 \mu\text{m}$.

Die kernnahe Partikelanreicherung basiert möglicherweise auf einer erhöhten Affinität der kationischen DY-682-markierten Calciumphosphat-Nanopartikel zur Membran.

Die *in vivo*-Verteilung der NIR-Farbstoff-markierten Nanopartikel wurde im athymischen Mausmodell (weibliche, Athymic nude-Fox1^{nu} Mäuse) mittels

Nahinfrarot-Fluoreszenz (NIRF) *in vivo*-Echtzeitbildgebung untersucht. Die DY-682-markierten thiolfunktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikel wurden intravenös (i.v.) über die Schwanzvene injiziert, und *in vivo* NIRF-Aufnahmen der Maus wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Injektion aufgenommen (Abb. 43). Wie in den erhaltenen *in vivo*-Aufnahmen zu sehen ist, verteilen sich die DY-682-markierten Nanopartikel sofort nach der Injektion im ganzen Körper auf Grund der schnellen Zirkulation der Partikel im Blut. Die intensivsten Fluoreszenzsignale bewegen sich den Verdauungstrakt entlang. In nächsten 4 Stunden nach der Injektion akkumulieren sich die fluoreszierenden Partikel hauptsächlich im Magen und Darm.

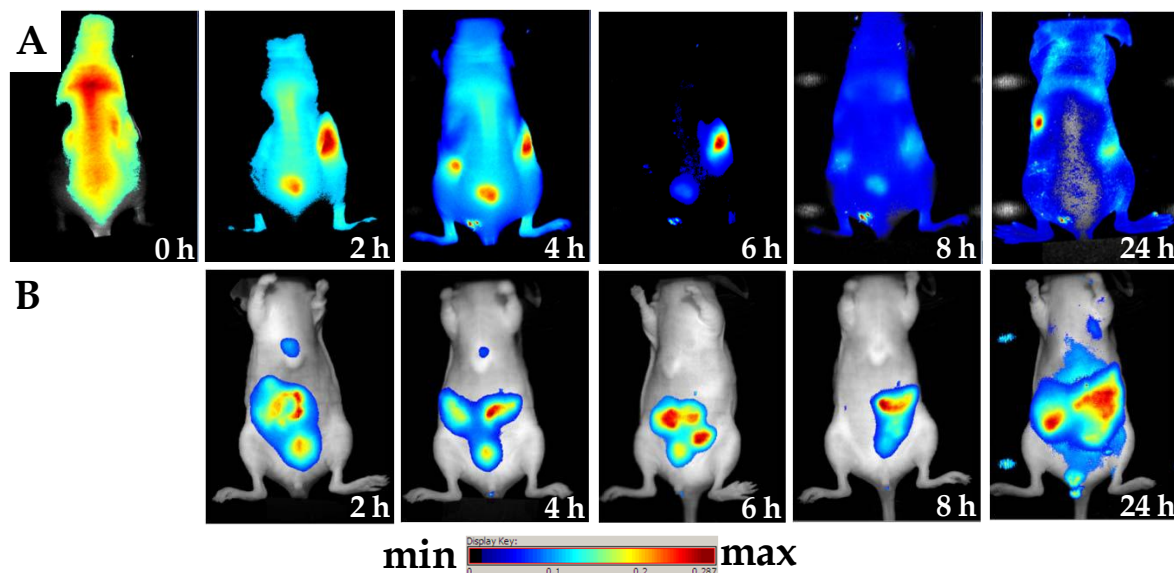


Abb. 43: *In vivo*-Verteilungskinetik der DY-682-markierten Calciumphosphat-Nanopartikel in der Maus nach der i.v. Injektion. A: Rückseite, B: Bauchseite. Die Fluoreszenzintensität der Aufnahmen ist nicht auf gleiche Skala normiert. Die injizierte Anzahl von Calciumphosphat-Nanopartikeln beträgt $7,8 \cdot 10^{10}$ Nanopartikel pro Maus.

Abbildung 44 zeigt die Fluoreszenzaufnahmen der Organe der seziierten Maus, die nach 24 Stunden Injektion aufgenommen wurden. Die markierten Partikel werden vor allen im Magen, Darm und Lungen beobachtet. Es ist auch hervorzuheben, dass die Fluoreszenzintensität in der Leber nach 24 Stunden Injektion stark reduziert ist. Eine relativ hohe Anreicherung der funktionalisierten Nanopartikel in der Lunge, wo die Aufnahme der Partikel

zunächst aus dem Blutstrom stattfindet, kann durch die leicht positive Oberflächenladung ($+23 \pm 6$ mV) der Partikel erklärt werden.

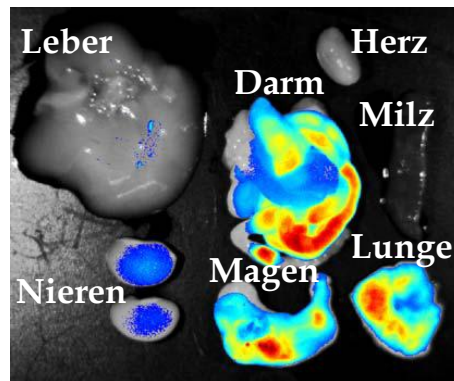


Abb. 44: Verteilung der DY-682-markierten Calciumphosphat-Nanopartikel in Organen nach 24 Stunden i.v. Injektion in der Maus.

Die starken Fluoreszenzsignale der Partikel im Darm und Magen können der Ausscheidung der Partikel mittels des Lebertransports durch den Darm zugeordnet werden.¹⁰⁴ Eine mögliche Erklärung für diesen Eliminierungsprozess könnte sein, dass die positiv geladenen Calciumphosphat-Nanopartikel einen Komplex mit den anionisch geladenen Gallenkomponenten bilden konnten und anschließend über die Fäzes ausgeschieden werden.

Die Anreicherung der NIR-fluoreszierenden Calciumphosphat-Nanopartikel durch Ausnutzung von passiven Targeting-Effekten im Tumorgewebe wird mit einer weiteren Versuchsreihe *in vivo* überprüft.

Die *in vivo*-Untersuchungen wurden von Frau M.Sc. K. Haedicke, Abteilung für Experimentelle Radiologie, Universitätsklinikum Jena, AG Prof. I. Hilger, durchgeführt.

3.4.2 Beladung der DY-682-markierten Nanopartikel mit dem Photosensibilisator

Die DY-682-markierten thiofunktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikel konnten erfolgreich mittels *in vivo* Nahinfrarot-Fluoreszenz (NIRF) verfolgt werden. Weiterhin wurde die Synthese eines nanopartikulären Systems durchgeführt, mit dem nicht nur die *in vivo*-Verteilungskinetik der Partikel verfolgt werden kann, sondern auch der Effekt gegen Tumorzellen untersucht werden kann.^{40, 98, 106, 107} Die potentiellen anti-Tumor-Wirkstoffe sind häufig kleine Moleküle, die eine schlechte Löslichkeit im Wasser besitzen und eine hohe systemische Toxizität aufweisen.¹⁰ Außerdem können diese kleinen Moleküle sehr schnell aus dem Körper entfernt werden, wodurch die Aufnahme von Arzneimitteln durch das Tumorgewebe geringer und die Dosierung für eine effektive Behandlung des Tumors behindert wird. Nanopartikel als Trägersystem von Wirkstoffen werden aufgrund der Verbesserung ihrer Aufnahme, der längeren Verweilzeit im Körper und des möglichen Targetings bereits in der Biomedizin eingesetzt.¹⁰⁷ Neben den bereits in der Tumorthherapie verwendeten Wirkstoffen¹⁰⁸⁻¹¹⁰ wurden die lichtaktiven Substanzen (Photosensibilisatoren) sehr häufig zur Beladung der Nanopartikel eingesetzt.^{38, 48, 111, 112}

mTHPC als Wirkstoff für die Photodynamische Therapie

Die Photodynamische Therapie (PDT) ist eine Form der Photochemotherapie, bei der die Interaktion eines Photosensibilisators mit sichtbarem Licht unter Vorhandensein von Sauerstoff durch die Produktion zytotoxischer Substanzen, insbesondere des Singulett-Sauerstoffes, zur Zell- und Gewebeschädigung mit nachfolgendem Zelltod führt.^{113, 114} In Abbildung 45 ist schematisch das Funktionsprinzip der Photodynamischen Therapie aufgeführt.

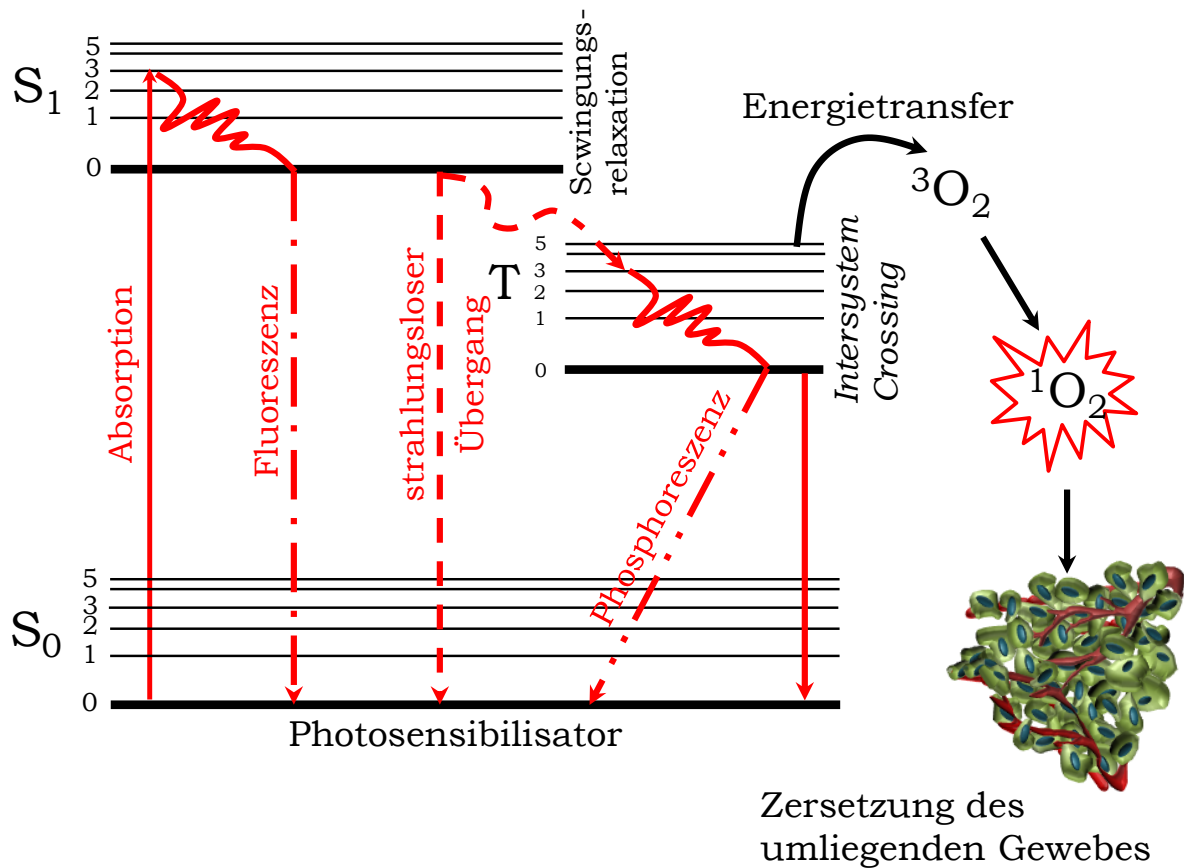


Abb. 45: Energiediagramm eines Photosensibilisators nach Lichtabsorption. Darstellung möglicher Energieübergänge und in Folge die Zersetzung des umliegenden Gewebes.

Durch Absorption von Licht geht der Photosensibilisator aus seinem Singulett-Grundzustand (S_0) in den ersten angeregten Singulett-Zustand (S_1) über. Zur Rückkehr von S_1 in den Grundzustand sind verschiedene Reaktionswege möglich: Fluoreszenz, *Intersystem Crossing* und Energietransfer. Der vorliegende angeregte Triplet-Zustand (T) ist ein metastabiles System, da aufgrund des Spinverbotes kein direkter Übergang in den Singulett-Grundzustand möglich ist. Die Energie des Triplet-Zustandes wird auf den Sauerstoff übertragen, es entsteht ein Singulett-Sauerstoff (1O_2).¹¹⁵ Durch seine kurze Lebensdauer ($<0,04 \mu s$) und kleinen Einwirkradius ($<0,02 \mu m$) wird die Zellschädigung auf den Ort der 1O_2 -Entstehung beschränkt.¹¹⁶ Die für die Photodynamische Therapie eingesetzten Photosensibilisatoren sollten eine chemisch reine Zusammensetzung und Stabilität, hohe Quantenausbeute und eine Akkumulationsselektivität im gezielten

Gewebe sowie eine hohe Photostabilität aufweisen.^{111, 115, 116} Bereits *in vitro* und *in vivo* untersuchte Photosensibilisatoren sind Porphyrine, Benzoporphyrine, Chlorine, Phthalocyanine, Naphthalocyanine und Safranine. Von diesen sind Porphyrine und Porphyrin-ähnliche Verbindungen die am häufigsten verwendeten Photosensibilisatoren.^{116, 117}

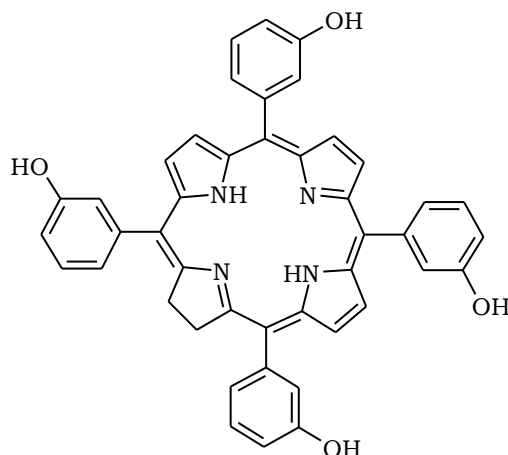


Abb. 46: Strukturformel von 5,10,15,20-Tetrakis(3-hydroxyphenyl)chlorin (mTHPC) zur Beladung der DY-682-markierten und thiofunktionierten Calciumphosphat-Nanopartikel.

Für die Beladung der Calciumphosphat-Nanopartikel als Trägersystem für die Photodynamische Therapie wurde Temoporfin (mTHPC) ausgewählt (Abb. 46), welches eine ausgezeichnete Ergänzung zu den bereits bestehenden *in vitro*-Ergebnissen von Schwartz *et al.*³⁸ und ein weiterer Schritt in Richtung der *in vivo*-Anwendung ist.

3.4.3 mTHPC-beladene und DY-682-markierte Nanopartikel

Die schon in Kapitel 3.4.1 gezeigte schematische Darstellung zur Markierung der thiofunktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikel wurde nachfolgend durch die Beladung mit mTHPC ergänzt (Abb. 47).

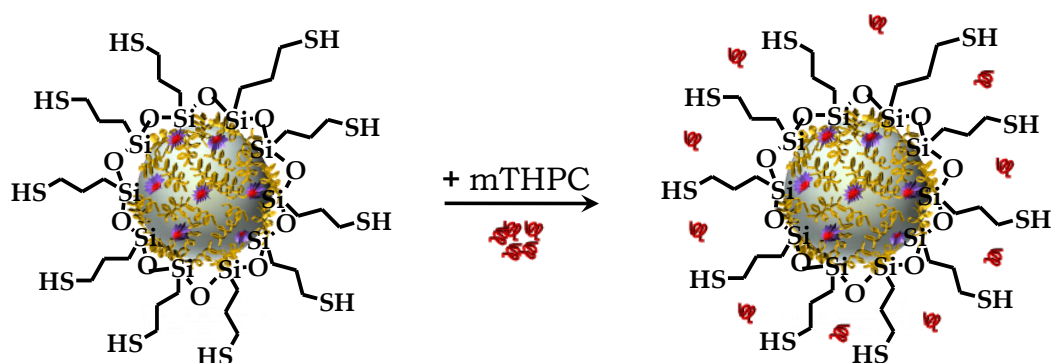
CaP/PEI/SiO₂/DY-682/SHCaP/PEI/SiO₂/DY-682/SH/mTHPC

Abb. 47: Schematische Darstellung zur Beladung der DY-682-markierten thiol-funktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln mit mTHPC.

Die charakteristischen Parameter der funktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikel sind in Abbildung 48 gezeigt. Die mittels DLS ermittelte Größenverteilung der Partikel nach der letzten Reinigung und Redispergierung ergibt eine enge Partikelgrößenverteilung mit einem PDI von 0,228 (Abb. 48, links). Der mittels DLS bestimmte hydrodynamische Durchmesser der Nanopartikel in Dispersion beträgt 198 nm. Wie auch in der vorherigen Synthese zur Markierung der Calciumphosphat-Nanopartikel mit dem DY-682-Farbstoff besitzen die Partikel nach der Beladung mit mTHPC eine positive Oberflächenladung mit einem Zetapotential von $+20 \pm 6$ mV. In der REMAufnahme sind 50-100 nm große Nanopartikel mit einer annähernd sphärischen Morphologie und einem gewissen Agglomerationsgrad zu erkennen (Abb. 48, rechts).

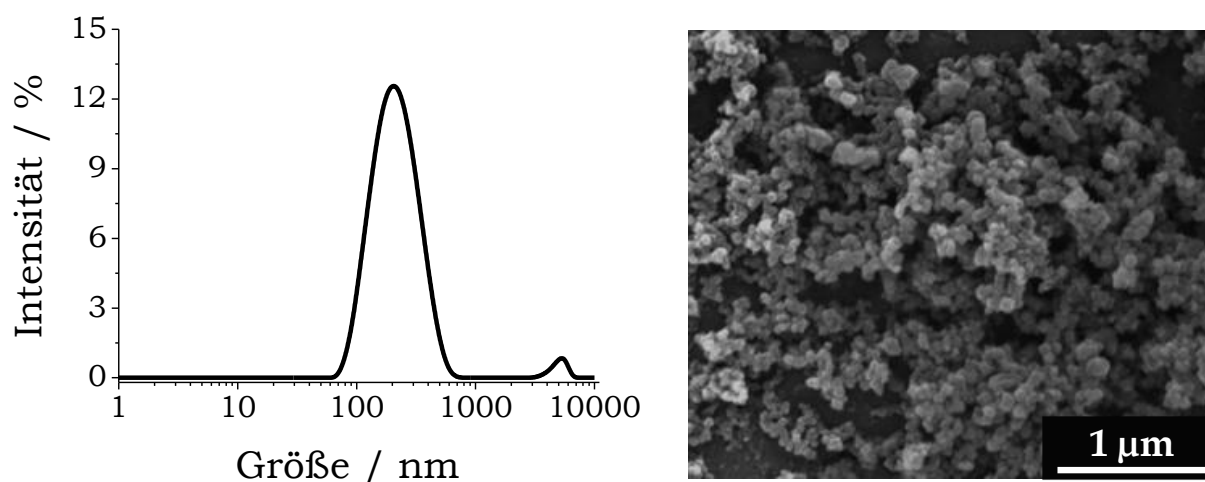


Abb. 48: Partikelgrößenverteilung (DLS) (*links*) und REM-Aufnahme (*rechts*) der DY-682-markierten und mTHPC-beladenen thioleffunktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikel.

Absorptions- und Emissionsspektrum der DY-682-markierten Calciumphosphat-Nanopartikel nach der Beladung mit mTHPC sind in Abbildung 49 dargestellt. Die optische Absorption der erhaltenen Nanopartikel ergibt mehrere Banden. Die Absorptionsmaxima bei 430 nm und bei 650 nm können dem an den Nanopartikeln gebundenen Temoporfin zugeordnet werden. Im Fluoreszenzspektrum der mTHPC-beladenen Partikel sind die charakteristischen Emissionsbanden von mTHPC mit λ_{max} von 656 nm und λ_{max} von 722 nm zu sehen. Da die Emissionswellenlänge der fluoreszierenden Nanopartikel im NIR-Bereich liegt, werden die Nanopartikel im Weiteren zur *in vivo*-Verfolgung eingesetzt.

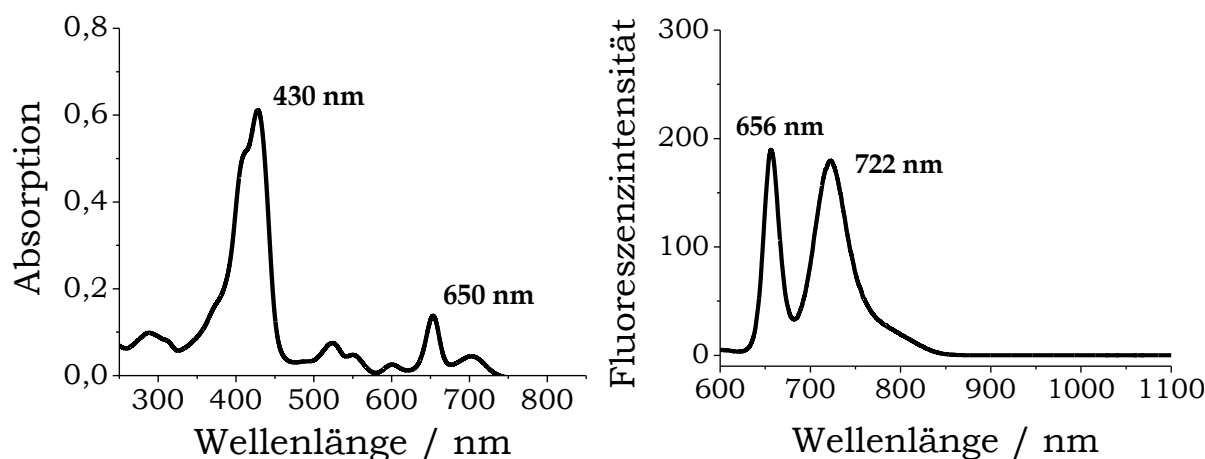


Abb. 49: UV-Vis-Spektrum (*links*) und Fluoreszenzspektrum (*rechts*) der Dispersion von DY-682-markierten und mTHPC-beladenen thiofunktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln in Wasser (Verdünnung 1:10 für Absorptionsmessung und 1:4 für Emissionsmessung).

Für die Auswertung des Beladungsgrads wurde die adsorbierte Menge von mTHPC an den Nanopartikeln spektroskopisch bestimmt.

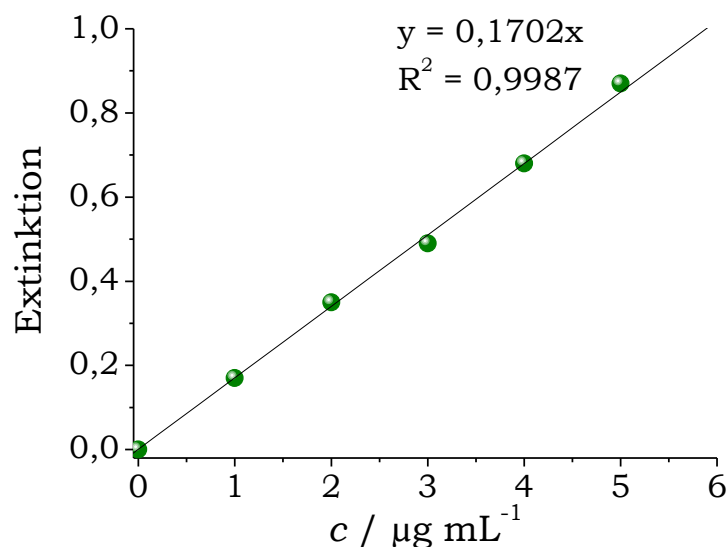


Abb. 50: Kalibrationsgerade von mTHPC für die Bestimmung der mTHPC-Konzentration nach der Beladung von Calciumphosphat-Nanopartikeln. Die Extinktion wurde bei der Wellenlänge von $\lambda = 422$ nm als Funktion der Konzentration aufgetragen (pH = 7,3).

Die Farbstoff-Quantifizierung der mTHPC-beladenen Nanopartikel erfolgte mittels UV-Vis-Spektroskopie und einer geeigneten Kalibrationsgerade (Abb. 50). Die praktisch bestimmte Konzentration des Farbstoffs nach der

Beladung beträgt $37,3 \mu\text{g mL}^{-1}$, die berechnete Molarität $5,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ($M_w = 0,68076 \text{ kg mol}^{-1}$ von mTHPC). Die mittels AAS ermittelte Konzentration von Ca^{2+} beträgt $46 \mu\text{g mL}^{-1}$ im Pellet nach der Zentrifugation der Partikel, entsprechend $115 \mu\text{g mL}^{-1}$ Calciumphosphat in der Dispersion (bezogen auf stöchiometrischen Hydroxylapatit, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$). Aus der berechneten Masse von Calciumphosphat kann die Partikelkonzentration pro 1 mL Dispersion berechnet werden. Entsprechend der REM-Aufnahme wird ein mittlerer Radius von einem Nanopartikel $r(\text{NP}) = 35 \cdot 10^{-9} \text{ m}$ angenommen. Die Berechnungen zeigen, dass nach der Synthese 1 mL Dispersion $2,0 \cdot 10^{11}$ Calciumphosphat-Nanopartikel enthält und jedes Partikel mit ca. 161000 mTHPC-Molekülen beladen ist.

Die zelluläre Aufnahme der DY-682-markierten und mTHPC-beladenen thiol-funktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikel wurde in Zungen-Plattenepithel-Karzinom-Zellen (CAL-27-Zellen) mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht (Abb. 51). Die erhaltenen fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen zeigen, dass die Partikel nach 24 Stunden Inkubation innerhalb der Zellen erfolgreich internalisiert wurden. Wie auch in Abbildung 51D zu sehen ist, sind die aufgenommenen Nanopartikel größtenteils in der extranuklearen Region lokalisiert.

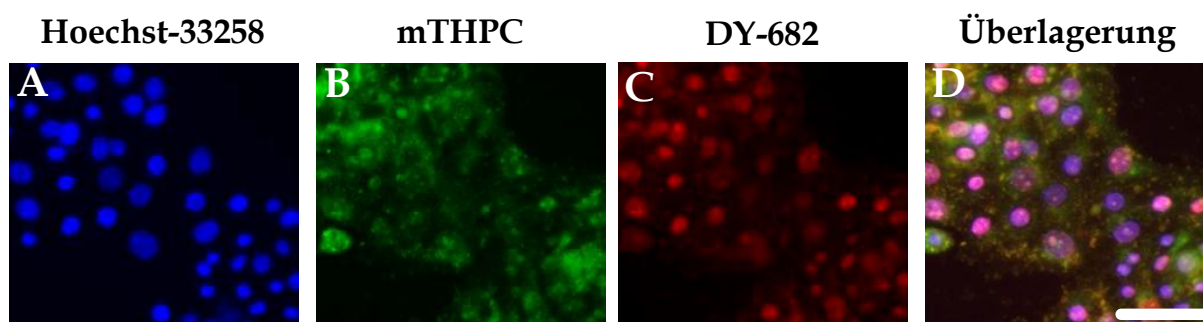


Abb. 51: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Zungen-Plattenepithel-Karzinom-Zellen (CAL-27-Zellen) nach 24 Stunden Inkubation mit DY-682-markierten und mTHPC-beladenen Calciumphosphat-Nanopartikeln. A: Färbung der Zellkerne mit Hoechst-33258; B: mTHPC-Kanal; C: DY-682-Kanal und D: Überlagerung der A-C Aufnahmen. Die verwendete Partikelkonzentration beträgt $1,6 \cdot 10^{10}$ Nanopartikel pro 10^5 Zellen, was einer durchschnittlichen Anzahl von $1,6 \cdot 10^5$ Nanopartikeln pro Zelle entspricht. Maßstab: $100 \mu\text{m}$.

Infolge der längeren Inkubationszeit (24 h) kommt es zu einer Verteilung der Fluoreszenz innerhalb des Zytosols. Die Fluoreszenzverstärkungen im Bereich des Zellkerns geben Hinweis darauf, dass nach der Auflösung von funktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln die freien Farbstoffe teilweise durch die Kernmembran durchdringen konnten.

Neben der zellulären Aufnahmen wurden die Biodistribution und Tumorakkumulation der Nanopartikel im athymischen Zungen-Plattenepithel-Karzinom Tumor-tragenden Mausmodell (weibliche, Athymic nude-Fox1^{nu} Mäuse) mittels Nahinfrarot-Fluoreszenz (NIRF) untersucht. Die DY-682-markierten und mTHPC-beladenen thiolfunktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikel wurden intravenös (i.v.) über die Schwanzvene injiziert und *in vivo* NIRF-Aufnahmen der Partikelverteilung im Körper, Tumorakkumulation und Ausscheidungsprofile zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Injektion aufgenommen (Abb. 52). In den ersten Stunden nach der Injektion sind die NIRF-Signale im ganzen Körper aufgrund der schnellen Verteilung der Partikel im Blut deutlich zu sehen. Nach 24 Stunden beobachtet man eine verstärkte Fluoreszenz der injizierten Nanopartikel in der Bauchhöhle. Nach 30 Stunden nimmt das Fluoreszenzsignal im Magen und Darm ab. Die Partikel werden über die Mechanismen des Lebertransports aus dem Organismus ausgeschieden.¹⁰⁴ Wiederum zeigt ein zunehmendes Fluoreszenzsignal der NIR-Farbstoff markierten Partikel im Tumor, dass ein größerer Teil der Nanopartikel innerhalb des Tumorgewebes durch den EPR-Effekt angereichert wurde.

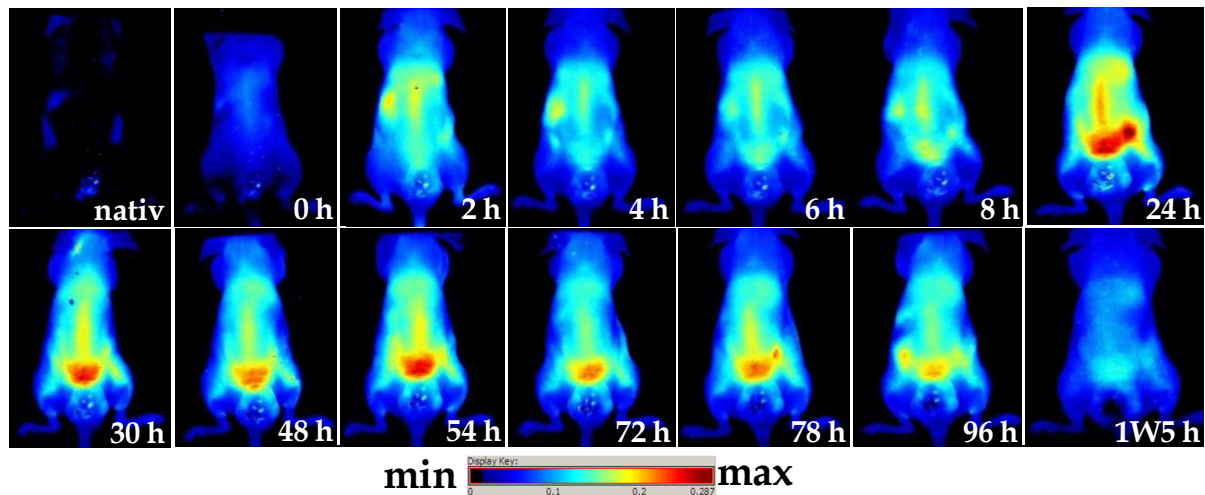


Abb. 52: *In vivo*-Verteilungskinetik der DY-682-markierten und mTHPC-beladenen Calciumphosphat-Nanopartikel in der Maus nach der i.v. Injektion. Die Fluoreszenzintensität der Aufnahmen ist nicht auf die gleiche Skala normiert. Die injizierte Anzahl von Calciumphosphat-Nanopartikeln beträgt $4,1 \cdot 10^{10}$ Nanopartikel pro Maus.

Nach einer Woche und 5 Stunden wurden die wichtigsten Organe (Leber, Lunge, Milz, Nieren, Herz, Darm, Magen und Tumorgewebe) für *ex vivo*-Untersuchungen isoliert (Abb. 53). Ein stark ausgeprägtes Fluoreszenzsignal im Tumor (Abb. 53B) zeigt, dass sich die Partikel im Tumorgewebe anreichern. Eine derartige Anreicherung ist durch den Farbstoff allein nicht möglich, da dieser schnell aus dem Blutstrom eliminiert wird. Dadurch ist die *ex vivo*-Aufnahme des Tumors ein möglicher Hinweis, dass sich die NIR-fluoreszierenden Calciumphosphat-Nanopartikel durch das passive Targeting im Tumor angereichert hatten.

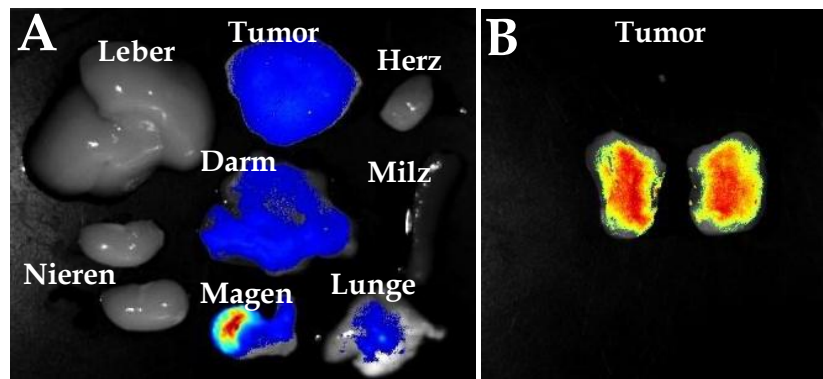


Abb. 53: Verteilung der DY-682-markierten und mTHPC-beladenen Calciumphosphat-Nanopartikel in Organen (A) und im halbierten Tumor (B) nach einer Woche und 5 Stunden i.v. Injektion in der Maus.

Die oben beschriebenen Ergebnisse weisen darauf hin, dass die dargestellten Calciumphosphat-Nanopartikel nach intravenöser Applikation durch passive Anreicherungsmechanismen wie den EPR-Effekt in Tumorgewebe akkumulieren. Der Effekt von mTHPC auf die Nanopartikel wird im Weiteren näher untersucht.

Die fluoreszenzmikroskopischen und *in vivo*-Untersuchungen wurden von Frau M.Sc. K. Haedicke, Abteilung für Experimentelle Radiologie, Universitätsklinikum Jena, AG Prof. I. Hilger, durchgeführt.

3.4.4 RGDfK-konjugierte multifunktionelle Nanopartikel

Zur Verbesserung der Aufnahme von Wirkstoff-beladenen Nanopartikeln im Tumor wurden die mTHPC-beladenen und DY-682-markierten Nanopartikel mit einem RGDfK-Peptid konjugiert (Abb. 54). RGD-Peptide sind besonders zur intratumoralen Anreicherung geeignet und können dadurch die spezifische Aufnahme von Partikeln verbessern. Diese Peptide binden am Integrin $\alpha\beta3$ auf dem aktivierten Endothel der angiogenen Blutgefäße.^{118, 119}

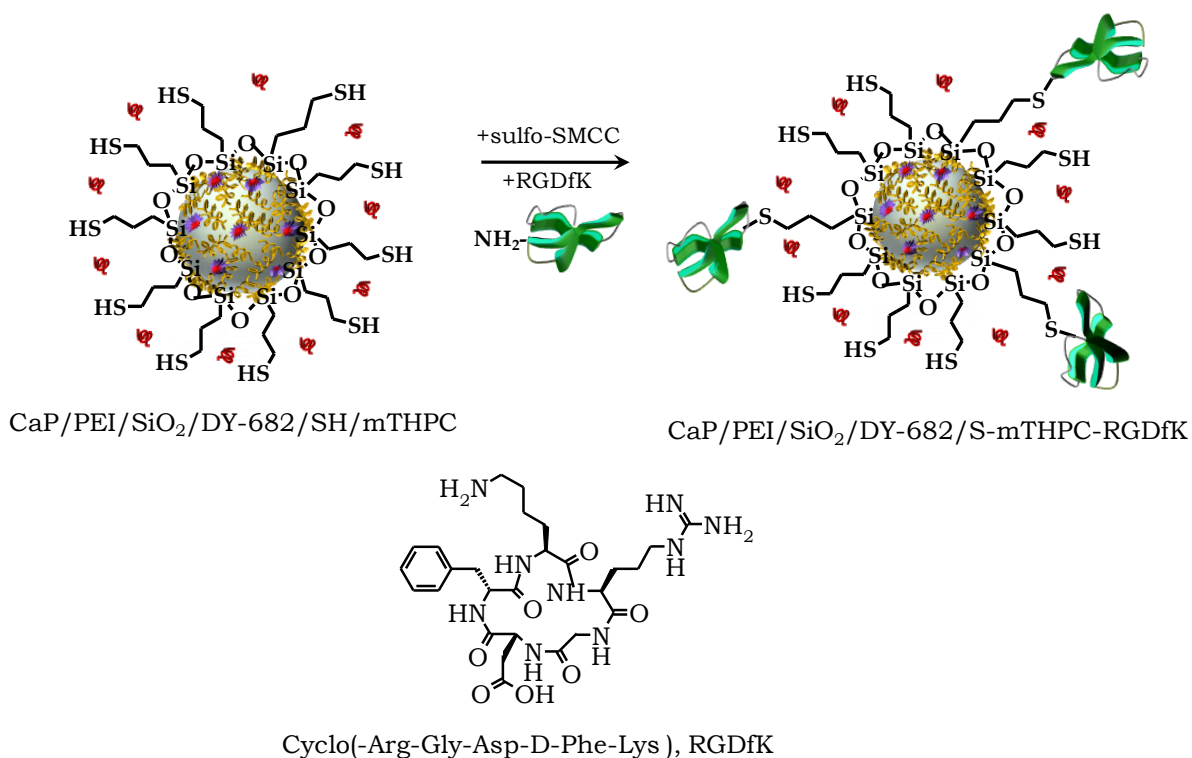


Abb. 54: Schematische Darstellung zur Konjugation der DY-682-markierten und mTHPC-beladenen thiolfunktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln mit dem RGDfK-Peptid.

Die charakteristischen Parameter der erhaltenen Calciumphosphat-Nanopartikel sind in Abbildung 55 gezeigt. Die mittels DLS ermittelte Größenverteilung der konjugierten Partikel nach der letzten Reinigung ergibt eine breitere Größenverteilung mit einem PDI von 0,227 (Abb. 55, links). Der mittels DLS bestimmte hydrodynamische Durchmesser der Nanopartikel in Dispersion beträgt 205 nm. Die Partikel haben eine positive Oberflächenladung mit einem Zetapotential von $+24 \pm 4$ mV. In der REM-Aufnahme sind

50-120 nm große Nanopartikel mit einer annähernd sphärischen Morphologie (Abb. 55, rechts) erkennbar. Die Vernetzung der Nanopartikel mit der organischen Matrix ist stärker im Vergleich zu den DY-682-markierten und mTHPC-beladenen Nanopartikeln, die nicht mit dem RGDfK-Peptid konjugiert wurden.

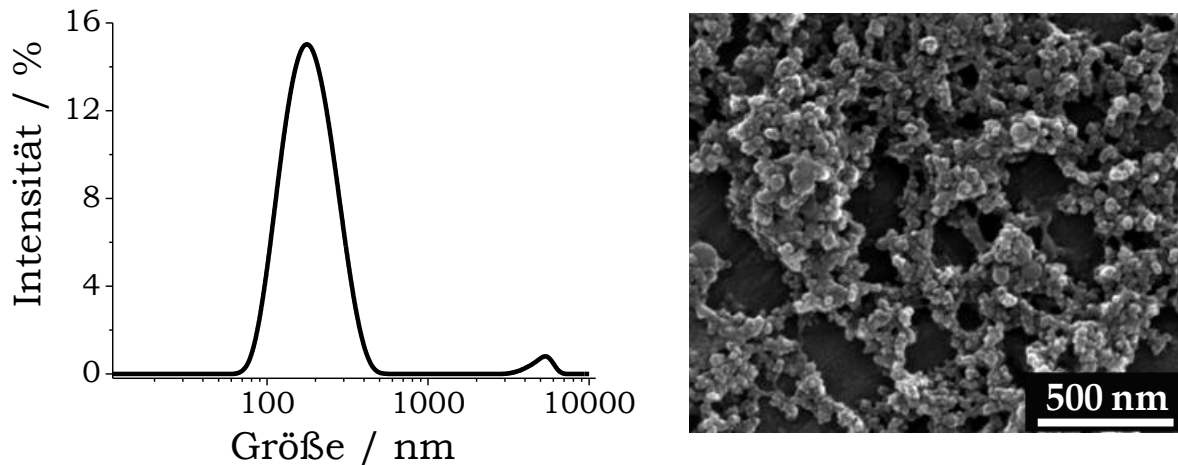


Abb. 55: Partikelgrößenverteilung (DLS) (*links*) und REM-Aufnahme (*rechts*) der RGDfK-konjugierten multifunktionellen Calciumphosphat-Nanopartikel.

Die multifunktionellen Nanopartikel wurden mittels UV-Vis- und Fluoreszenzspektroskopie charakterisiert (Abb. 56). Das Absorptionsspektrum von RGDfK-konjugierten Nanopartikeln zeigt ein hohes Maximum bei 430 nm und ein kleineres bei 650 nm. Im Fluoreszenzspektrum der Farbstoff-beladenen Partikel sind die charakteristischen Emissionsbanden von mTHPC zu detektieren. Diese Spektren ähneln den Spektren von gelöstem mTHPC. Die Konjugation der Partikel mit dem RGDfK-Peptid hat die Fluoreszenzeigenschaften von mTHPC nicht verändert. Somit liegen die Emissionsbanden der funktionalisierten Nanopartikel in dem NIRF-Fenster (700-1000 nm), und ihre spektroskopischen Eigenschaften können für die *in vivo*-Bildgebung verwendet werden.

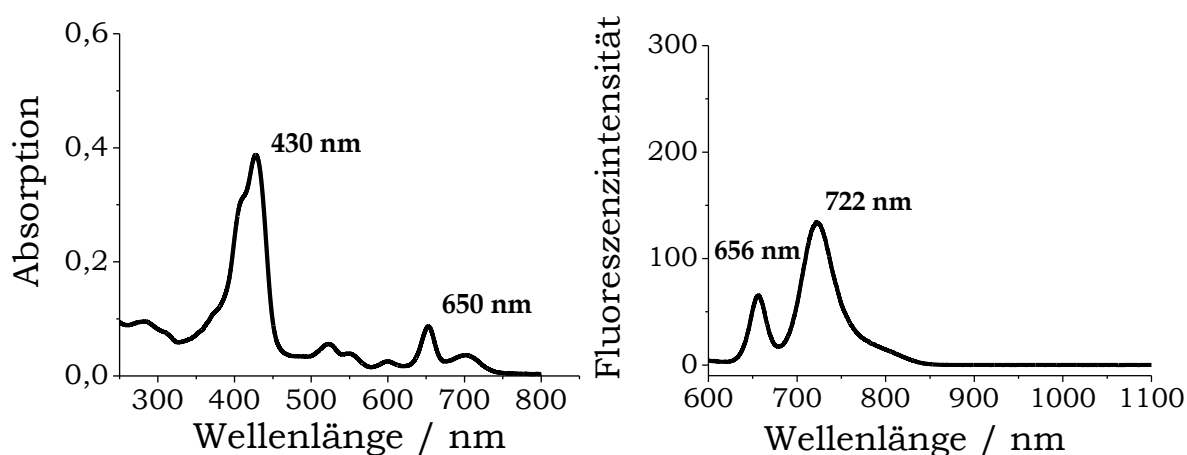


Abb. 56: UV-Vis- (*links*) und Fluoreszenzspektrum (*rechts*) der Dispersion von RGDfK-konjugierten fluoreszierenden Calciumphosphat-Nanopartikeln in Wasser (Verdünnung 1:10 für Absorptionsmessung und 1:4 für Emissionsmessung).

Für die Auswertung des Beladungsgrads wurde die adsorbierte Menge von mTHPC an den Nanopartikeln nach der Konjugation mit dem RGDfK-Peptid spektroskopisch bestimmt. Die mTHPC-Quantifizierung der funktionalisierten Nanopartikel erfolgte mittels UV-Vis-Spektroskopie und einer geeigneten Kalibrationsgerade (Kap. 3.4.3; Abb. 50). Die bestimmte Konzentration der adsorbierten mTHPC-Menge beträgt $22,7 \mu\text{g mL}^{-1}$, die berechnete Molarität $3,3 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ($M_w = 0,68076 \text{ kg mol}^{-1}$ von mTHPC). Die mittels AAS ermittelte Konzentration von Ca^{2+} beträgt $24 \mu\text{g mL}^{-1}$ im Pellet nach der Zentrifugation der Partikel, entsprechend $60 \mu\text{g mL}^{-1}$ Calciumphosphat in der Dispersion (bezogen auf stöchiometrischen Hydroxylapatit, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$). Aus der berechneten Masse von Calciumphosphat lässt sich die Partikelkonzentration pro 1 mL Dispersion berechnen. Entsprechend der REM-Aufnahme wird ein mittlerer Radius eines Nanopartikels mit $r(\text{NP}) = 35 \cdot 10^{-9} \text{ m}$ angenommen. Die Berechnungen zeigen, dass nach der Synthese 1 mL Dispersion $1,1 \cdot 10^{11}$ Calciumphosphat-Nanopartikel enthält und jedes Partikel mit ca. 188000 mTHPC-Molekülen beladen ist.

3.4.5 Einsatz der multifunktionellen Nanopartikel in PDT

Multifunktionelle Calciumphosphat-Nanopartikel bestehen aus einem anorganischen Kern als Träger, aus einem NIR-Farbstoff für die *in vivo*-Bildgebung, aus dem Photosensibilisator mTHPC als Wirkstoff für die PDT des Tumors und aus dem RGDfK-Peptid für gezieltes Targeting des Trägersystems an Endothelzellen im Tumor. Die therapeutische Wirksamkeit der PDT nach der Applikation der multifunktionellen Calciumphosphat-Nanopartikel wurde mit dem multiplexen Bildgebungsverfahren ausgewertet.¹²⁰ Das Verfahren umfasst die Auswertung der PDT-Wirksamkeit durch die Detektion der apoptotischen Zellen im Tumor mit DY-734 Annexin V und die Detektion der Vaskularisierung im Tumor mit IRDye® 800CW RGD (Abb. 57).

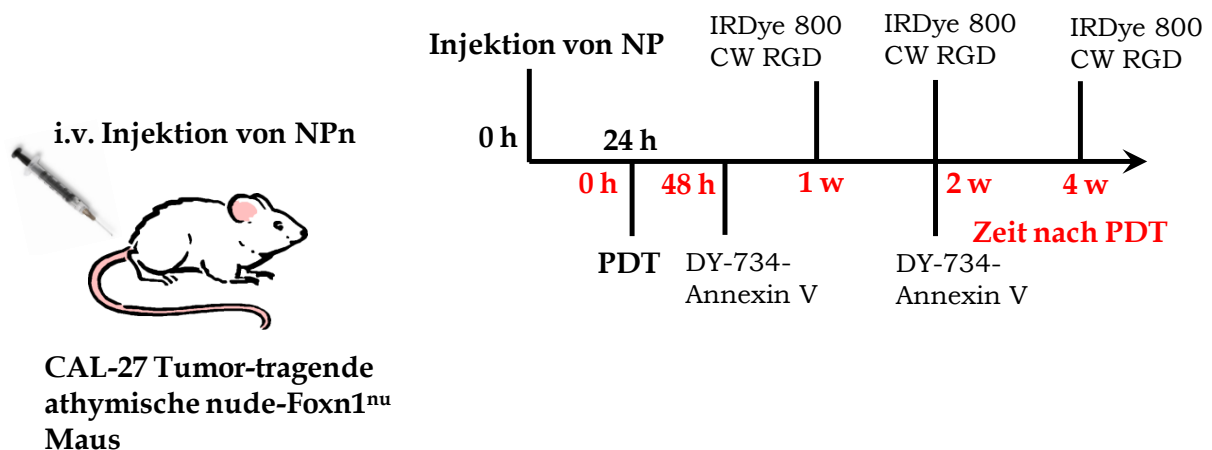


Abb. 57: Protokoll zur *in vivo*-Applikation und Photodynamischer Therapie von RGDfK-konjugierten multifunktionellen Calciumphosphat-Nanopartikeln sowie die Auswertung der PDT-Effektivität über die Detektion der apoptotischen Zellen im Tumor und die Vaskularisierung des Tumors mittels *in vivo*-Bildgebung.

Apoptotische Tumorzellen können 2 Tage nach der PDT mit DY-734 Annexin V abgebildet werden (Abb. 58). Im Gegensatz zu 2 Wochen nach PDT verringert sich die Fluoreszenz innerhalb des Tumors mit der Zeit nach der Injektion. Nach 24 und 48 Stunden kann fast keine Fluoreszenz mehr nachgewiesen werden. Die entsprechende halbquantitative Auswertung der

Fluoreszenzintensitäten 2 Tage nach der PDT zeigt einen stetigen Anstieg des Fluoreszenzkontrasts von DY-734 Annexin V zwischen Tumor und Muskel mit der Zeit nach der Injektion, insbesondere von 2 bis 48 Stunden. Während der 2 Wochen nach der PDT verringert sich der Kontrast nach der Injektion (Abb. 58B). Insbesondere von 6 bis 48 Stunden nach der Injektion von DY-734 Annexin V ist der Fluoreszenzkontrast im Tumor höher 2 Tage nach PDT im Vergleich zu 2 Wochen nach der PDT.

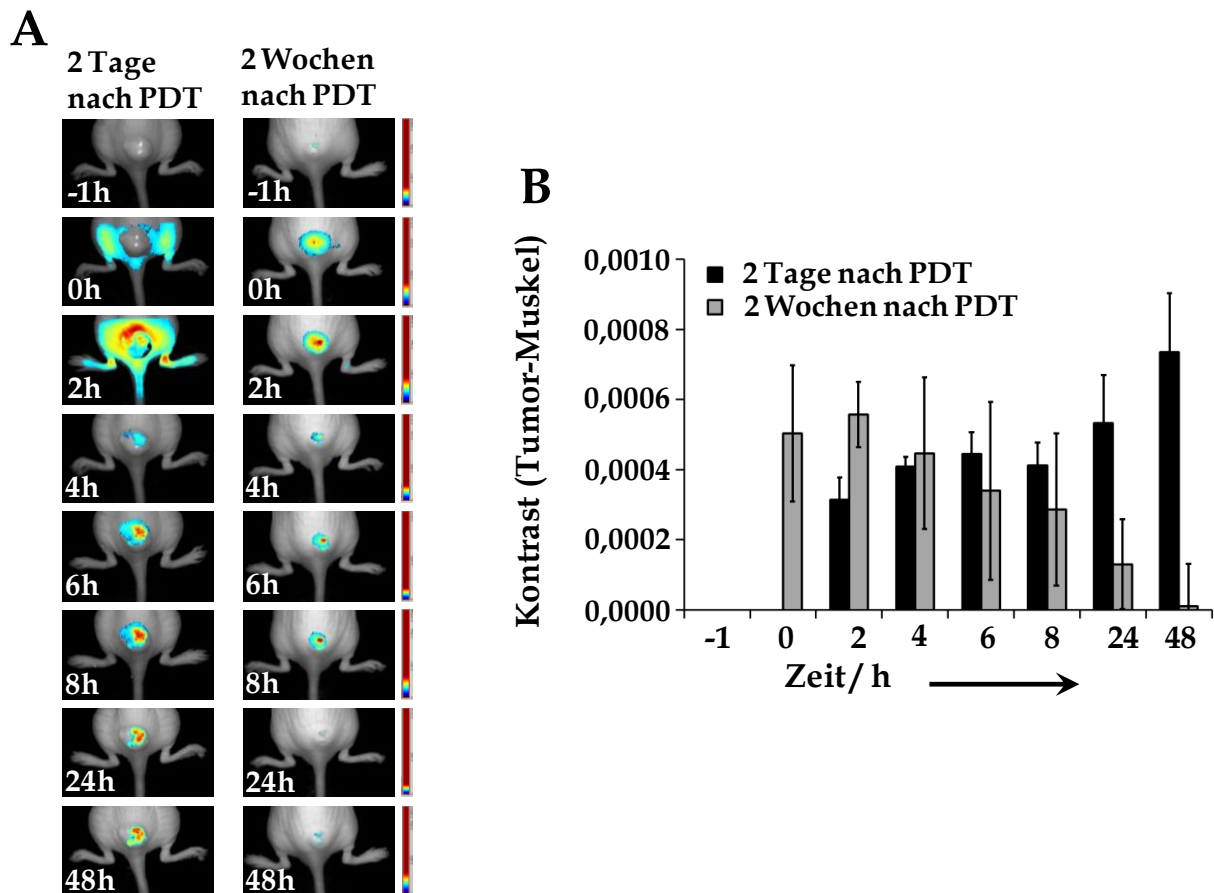


Abb. 58: *In vivo*-Detektion von PDT-induzierten apoptotischen Zellen im Tumor 2 Tage oder 2 Wochen nach der PDT und biologische Verteilung von DY-734 Annexin V. **A:** Repräsentative Aufnahmen der Verteilung von DY-734 Annexin V in CAL-27-Tumor-tragenden Mäusen 2 Tage (linke Spalte) und 2 Wochen (rechte Spalte) nach der PDT. **B:** Fluoreszenzkontrast (Tumor-Muskel) von DY-734 Annexin V in Xenograft-Mäusen.

Mittels NIRF-Bildgebung kann eine Reduktion der Vaskularisierung im Tumor mit der Zeit nach der PDT beobachtet werden. Im Vergleich zum Tumor vor der Therapie (0 Wochen), wenn eine homogene Verteilung der

Fluoreszenz von IRDye® 800CW RGD nachgewiesen werden kann, wird ein reduziertes Fluoreszenzsignal mit einzelnen selektiven fluoreszierenden Punkten zu späteren Zeitpunkten detektiert (Abb. 59A). Die stärkste Abnahme der Fluoreszenzintensität wird eine Woche nach der PDT festgestellt. Die Fluoreszenzintensität erhöht sich leicht 2 Wochen nach der PDT, erreicht aber nicht das Ausgangsniveau. Die Fluoreszenz nimmt 4 Wochen nach der Therapie wieder ab und zeigt einen ähnlichen Wert wie nach einer Woche. Gleichzeitig mit der Abnahme der Vaskularisierung im Tumor verringert auch das Tumolvolumen bei 3 von 4 Tieren mit der Zeit nach der PDT (Abb. 59B). Ein erhöhtes Wachstum des äußeren Tumorbereichs kann in einer Maus zwei Wochen nach der Therapie nachgewiesen werden.

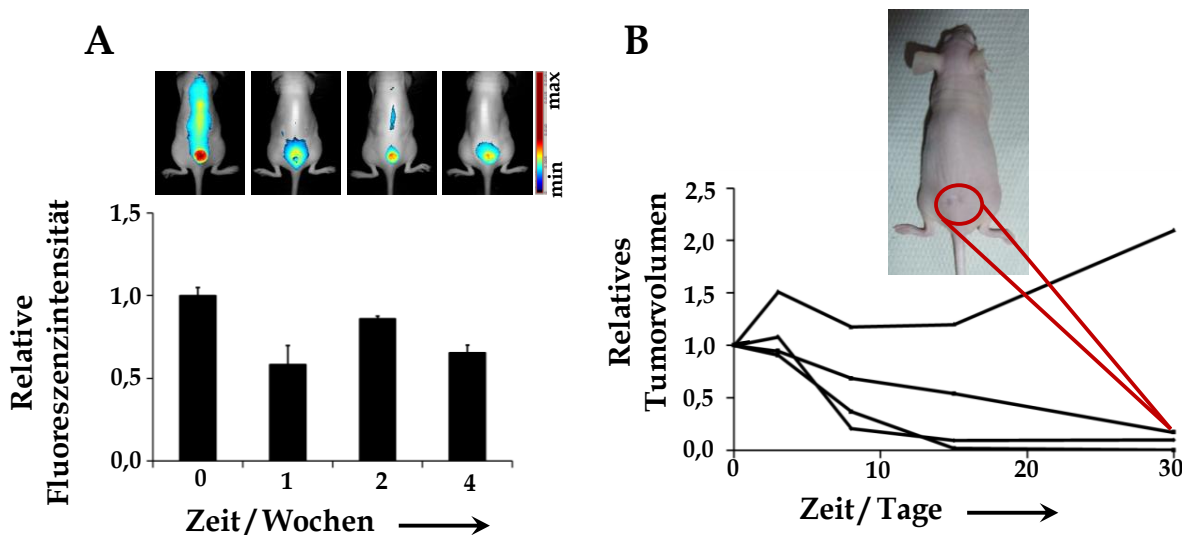


Abb. 59: Reduktion der Tumorgefäßbildung und des Tumolvolumens nach der PDT und biologische Verteilung von IRDye® 800CW RGD. **A:** Repräsentative Aufnahmen der Verteilung von IRDye® 800CW RGD in CAL-27-Tumor-tragenden Mäusen vor der PDT sowie auch 1, 2 und 4 Wochen nach der PDT. **B:** Volumen der CAL-27-Tumore in PDT-behandelten Mäusen in Abhängigkeit von der Zeit.

Die erhaltenen Ergebnisse der PDT-Effektivität nach der Applikation der multifunktionellen Calciumphosphat-Nanopartikel zeigen, dass Calciumphosphat-Nanopartikel mittels NIRF-Bildgebung *in vivo* verfolgt werden können. Die Beladung mit mTHPC und die Konjugation mit dem RGDfK-

Peptid ermöglichen einen Einsatz in der PDT und ein gezieltes Targeting. Die Nanopartikel zeigen eine effektive therapeutische Wirksamkeit und sind in der Lage, die Apoptose und Zerstörung der Tumorgefäßbildung zu bewirken. Somit stellen die multifunktionellen Calciumphosphat-Nanopartikel ein vielversprechendes Trägersystem sowohl für die *in vivo*-Bildgebung als auch für therapeutische Zwecke dar.

Die *in vivo*-Untersuchungen wurden von Frau M.Sc. K. Haedicke, Abteilung für Experimentelle Radiologie, Universitätsklinikum Jena, AG Prof. I. Hilger, durchgeführt.

3.5 Beladung der Nanopartikel mit Biomolekülen

Der Transport von Biomolekülen in lebende Zellen wird in der Biomedizin und Pharmazie erforscht. Zur Adressierung von Rezeptoren oder Enzymen in die Zelle müssen die Moleküle die Zellmembran durchdringen. Das Eindringen von fremdem DNA-Plasmid in eukaryotische Zellen und der weitere Transport in den Kern (Transfektion) ist eine wesentliche Voraussetzung für die Analyse der Genstruktur, der Funktion und der Regulation von Zellen.¹³ Beim *gene silencing* wird die Biosynthese eines bestimmten Proteins in der Zelle selektiv gehemmt. Dazu müssen kurze Oligonukleotide in das Zytoplasma eingebracht werden und danach mit zellulärer m-RNA interagieren.⁴⁴ Da die Nukleinsäuren die Zellmembran allein nicht durchdringen können, ist ein nanopartikuläres Trägersystem notwendig.⁶⁹ Ein solches nanopartikuläres Trägersystem stellen die bereits entwickelten Silica-modifizierten Calciumphosphat-Nanopartikel dar (Abb. 60).

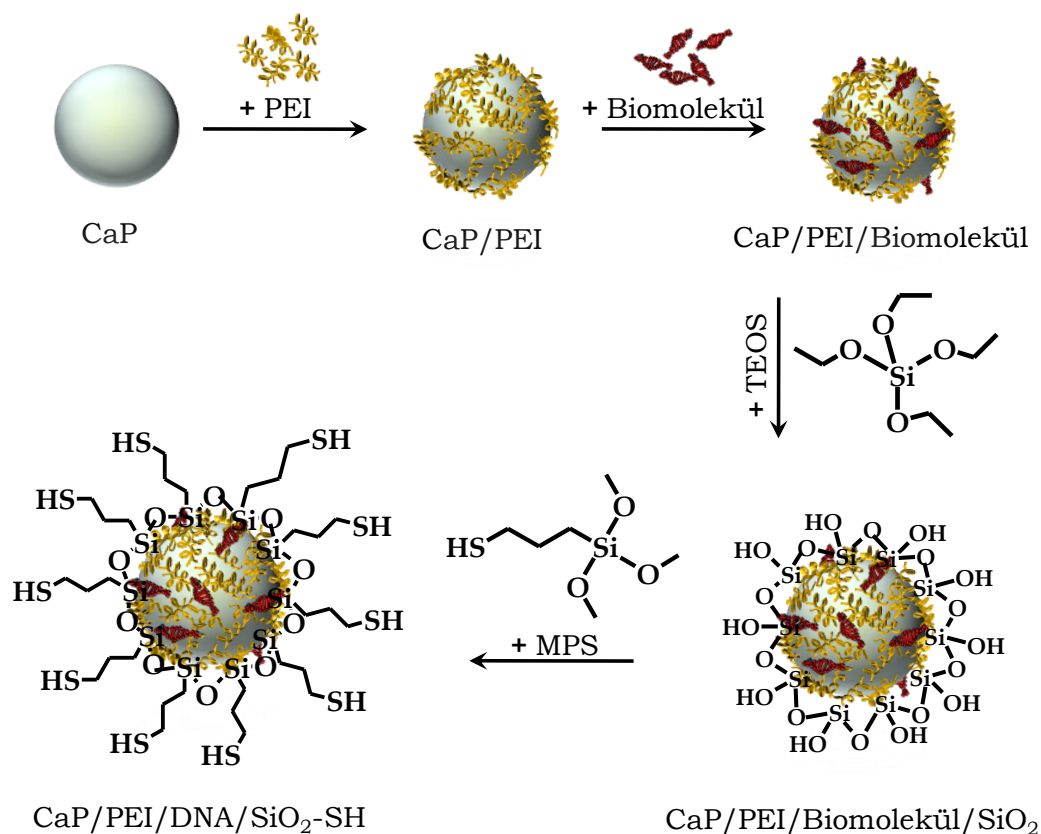


Abb. 60: Schematische Darstellung zur Beladung der thiofunktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikel mit Biomolekülen (z.B. CpG, DNA-Plasmide). Beispielhaft ist im Schema die Funktionalisierung mit Thiolgruppen gezeigt. Die Funktionalisierung mit Aminogruppen ist ebenfalls möglich.

Die zelluläre Aufnahme von CpG-beladenen Nanopartikeln und der Transfektionseffizienz von EGFP-DNA-beladenen Nanopartikeln wurde mittels CLSM oder Fluoreszenzmikroskopie, d.h. durch das Fluoreszenzsignal der markierten Oligonukleotide oder die Expression des grün fluoreszierenden Proteins (EGFP), untersucht.

3.5.1 Mit Fluoreszenz-markiertem CpG beladene Nanopartikel

CpG-Oligonukleotide können in der Immuntherapie gegen verschiedene Krankheiten wie Krebs, Allergien/Asthma und Infektionskrankheiten eingesetzt werden. Durch die Erkennung des humanen Toll-like Rezeptors 9 (TLR9) in B-Zellen und Antigen-präsentierenden Zellen induzieren die Oligonukleotide die Bildung verschiedener Interleukine und stärken hierdurch das Immunsystem.^{121, 122} Die Beladung des Trägersystems mit Oligonukleotiden hat mehrere Vorteile gegenüber den gelösten Molekülen. Die Biomoleküle können vor dem Abbau durch Nukleasen geschützt werden und somit die Effizienz der zellulären Aufnahme verbessern.¹²¹ Die Arbeiten von Sokolova *et al.* und Knuschke *et al.* zeigten, dass dreischalige CpG-beladene Calciumphosphat-Nanopartikel⁴³ die angeborene und adaptive Immunität durch die Aktivierung von dendritischen Zellen induzieren können.^{14, 45}

Die Entwicklung der CpG-beladenen Calciumphosphat-Nanopartikel nach der Modifizierung mit einer Silica-Schale für weitere Konjugationsmöglichkeiten, z.B. die Konjugation mit Antikörpern, war die nächste Zielsetzung dieser Arbeit.

Gemäß der entwickelten Synthese ist die Beladung mit CpG nach der Stabilisierung der Calciumphosphat-Nanopartikel mit einem kationischen Polymer PEI möglich (Abb. 60). Durch die Stabilisierung mit PEI ist die Partikeloberfläche positiv geladen und hat eine gewisse Beladungskapazität für das negativ geladene CpG-Molekül. Die darauf folgende Silica-Schale und die Funktionalisierung mit Thiolgruppen haben nicht nur schützende Eigenschaften, sondern werden auch für die weitere Synthese genutzt.

Die kolloidalen Eigenschaften von CpG-beladenen Nanopartikeln wurden mittels DLS und REM untersucht. Der mittels DLS ermittelte mittlere hydrodynamische Durchmesser liegt bei 161 nm mit einem Polydispersitätsindex von 0,205. In der REM-Aufnahme sind 60-120 nm große Partikel der sphärischen Morphologie zu erkennen (Abb. 61).

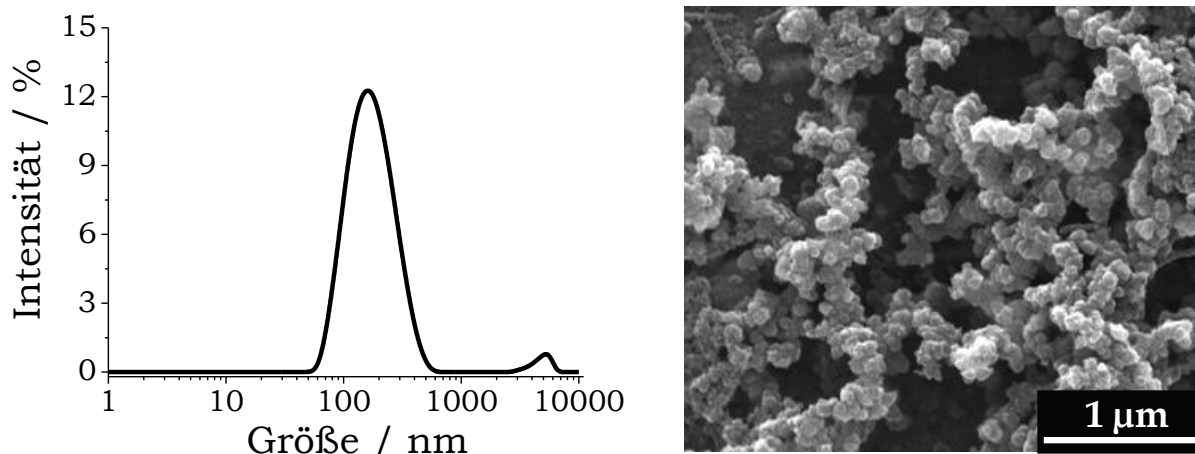


Abb. 61: Partikelgrößenverteilung (DLS) (*links*) und REM-Aufnahme (*rechts*) der CpG-beladenen thiolektionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikel.

Die mittels AAS ermittelte Konzentration von Ca^{2+} beträgt $42 \mu\text{g mL}^{-1}$ im Pellet nach der Zentrifugation der Partikel, entsprechend $105 \mu\text{g mL}^{-1}$ Calciumphosphat in der Dispersion. Die Berechnungen der Partikelkonzentration unter Annahme eines mittleren Radius von $r(\text{NP}) = 60 \cdot 10^{-9} \text{ m}$ ergeben, dass nach der Synthese 1 mL Dispersion $3,7 \cdot 10^{10}$ Calciumphosphat-Nanopartikel enthält.

Je nach gewünschter Anwendung, wie z.B. Durchflusszytometrie, konfokaler Laser-Scanning Mikroskopie (CLSM), besteht ein großes Interesse an fluoreszierenden Nanopartikeln. Fluoreszierende Partikel lassen sich z.B. wie in Kap. 3.2.1 und 3.2.2 beschrieben darstellen, indem die Nanopartikel mit einem Farbstoff konjugiert werden. Eine andere Möglichkeit wäre die Beladung der Nanopartikel mit fluoreszierenden Biomolekülen. Um die Aufnahme von CpG-beladenen Nanopartikeln in Zellen nachzuweisen, wurden verschiedene Fluoreszenz-markierte CpG-Moleküle (CpG-Alexa488, CpG-Alexa555 und CpG-Alexa647) verwendet, um die Calciumphosphat-Nanopartikel damit zu beladen.

Die HeLa-Zellen wurden mit diesen Nanopartikeln inkubiert und die Aufnahmen nach sieben Stunden unter einem CLSM verfolgt (Abb. 62). Eine deutliche Lokalisierung der grün- und rot-fluoreszierenden partikulären Strukturen um den Zellkern herum ist in allen CLSM-Aufnahmen zu sehen.

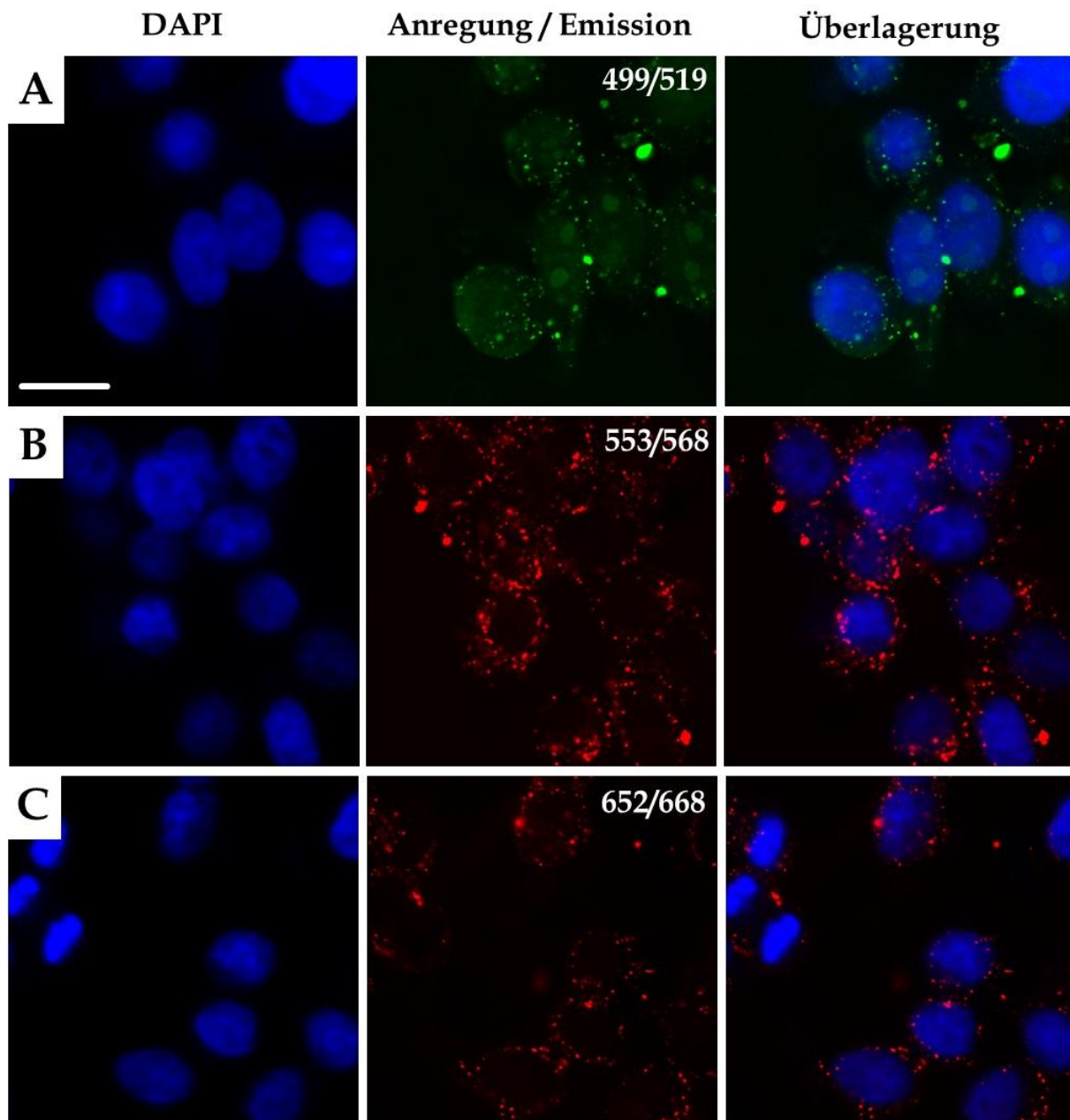


Abb. 62: CLSM-Aufnahmen der HeLa-Zellen nach 7 Stunden Inkubation mit CpG-Alexa-Farbstoff-beladenen Calciumphosphat-Nanopartikeln. Die Zellkerne sind mit DAPI (blau) angefärbt. A: CaP/PEI/CpG-Alexa 488/SiO₂-SH; B: CaP/PEI/CpG-Alexa 555/SiO₂-SH und C: CaP/PEI/CpG-Alexa 647/SiO₂-SH. Die gegebene Partikelkonzentration beträgt $2,9 \cdot 10^9$ Nanopartikel pro 10^5 Zellen, was einer durchschnittlichen Anzahl von $2,9 \cdot 10^4$ Nanopartikeln pro Zelle entspricht. Maßstab: 10 μ m.

Teilweise ist eine homogene Verteilung des grünen und roten Signals der Fluoreszenzfarbstoffe in den Zellen erkennbar, was auf einen fortgeschrittenen Abbau der Calciumphosphat-Nanopartikel im Lysosom hin-

deutet.⁶⁹ Somit konnte in diesen Experimenten eine effektive Aufnahme der CpG-beladenen Nanopartikel durch HeLa-Zellen nachgewiesen werden, sodass die Silica-modifizierten Nanopartikel als gut geeignetes Trägersystem für Biomoleküle angesehen werden können.

3.5.2 Beladung mit DNA-EGFP zur Transfektion

Transfektion ist das Einbringen von fremdem genetischem Material (DNA; RNA) in eukaryotische Zellen. Dadurch wird die gewünschte Proteinsynthese reguliert, z.B. Herstellung oder Austausch eines defekten Proteins, Blockierung der Überexpression, Erwerb neuer Eigenschaften der Zellen.¹²³

Da freie Nukleinsäuren nicht in der Lage sind, die Zellmembran zu penetrieren, wird ein geeignetes Trägersystem benötigt.¹³ Als eines der am häufigsten verwendeten anorganischen Materialien in Biochemie und Biotechnologie werden Calciumphosphat-Nanopartikel auch für den Gentransfer bereits eingesetzt.^{13, 123-126} Calciumphosphat-Nanopartikel werden seit mehr als 35 Jahren³⁴ aufgrund ihrer Biokompatibilität, biologischen Abbaubarkeit und höher Affinität zu Nukleinsäuren für die Transfektion verschiedener Zelllinien, z.B. Fibroblasten, Osteoblasten und Tumorzellen, verwendet.^{35, 127-130} Im Laufe der Zeit wurden neue Strategien für die Synthese der Calciumphosphat-Nanopartikel als DNA-Träger mit einer erhöhten kolloidalen Stabilität entwickelt. Kakizawa *et al.* synthetisierten die DNA-beladenen Nanopartikel, die mit einem Block-Copolymer modifizierten wurden.^{37, 131} Chowdury *et al.* konstruierten erfolgreich ein DNA-Calciumphosphat-Nanohybrid, das mit einer extrazellulären Matrix (Kollagen oder Fibronektin) beschichtet wurde.¹³² Die Forschungsarbeit von Sokolova *et al.* zeigte eine verbesserte Stabilität und Transfektionseffizienz von Polyethylenimin-beschichteten Calciumphosphat-Nanopartikeln.¹³³

Im Anschluss an die Arbeiten zur Modifikation der Partikelsynthese wurden die Transfektionsmöglichkeiten der Silica-modifizierten PEI-stabilisierten Partikel getestet. Zum Einen ermöglicht die PEI-Schale die Beladung der

Partikel mit DNA und verbessert das Eindringen in die Zelle, zum Anderen schützt die äußere Silica-Schicht vor Nukleasen und bietet weitere Konjugationsmöglichkeiten. Die schematische Darstellung der Partikelsynthese ist in Abbildung 63 gezeigt. Wie schon oben diskutiert wurde, stehen die Partikelgröße und Stabilität des hergestellten Systems im Fokus für eine erfolgreiche Transfektion.^{134, 135} Deshalb wurden die kolloidchemischen Eigenschaften der synthetisierten Partikel mittels DLS und REM charakterisiert. Der hydrodynamische Durchmesser der Nanopartikel in Dispersion beträgt 287 nm mit einem PDI von 0,24 (Abb. 63, links). Die REM-Aufnahme bestätigt die kugelförmige Morphologie der Partikel (Abb. 63, rechts).

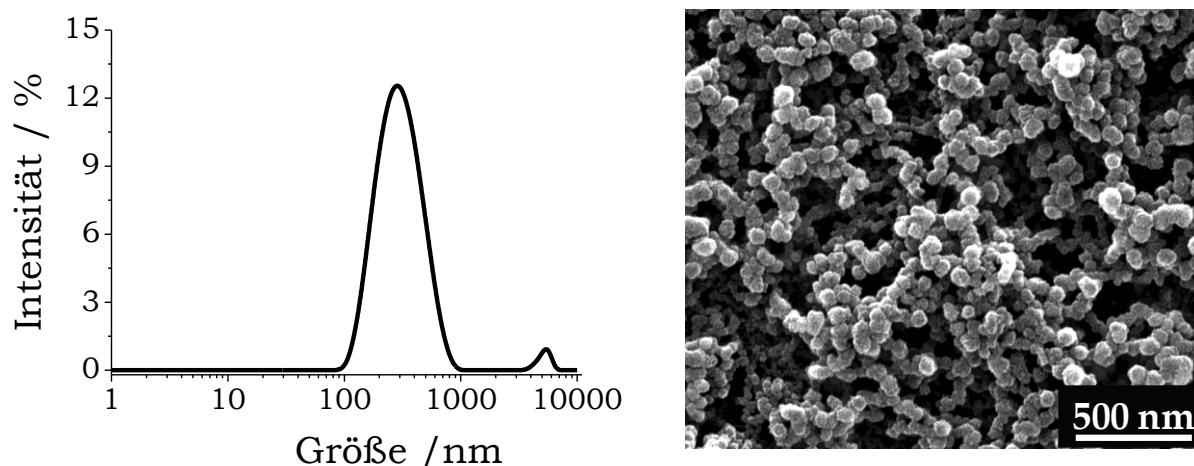


Abb. 63: Partikelgrößenverteilung (DLS) (*links*) und REM-Aufnahme (*rechts*) der EGFP-DNA-beladenen thiofunktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikel.

Die mittels AAS ermittelte Konzentration von Ca^{2+} beträgt $74 \mu\text{g mL}^{-1}$ im Pellet nach der Zentrifugation der Partikel, entsprechend $185 \mu\text{g mL}^{-1}$ Calciumphosphat in der Dispersion. Die Berechnungen der Partikelkonzentration pro 1 mL Dispersion unter der Annahme eines mittleren Radius von $r(\text{NP}) = 60 \cdot 10^{-9} \text{ m}$ zeigen, dass nach der Synthese 1 mL Dispersion $6,5 \cdot 10^{10}$ Calciumphosphat-Nanopartikel enthält. Die Quantifizierung der an den Nanopartikeln gebundenen DNA-Menge wurde durch die Messung der UV-Absorption bei 260 nm durchgeführt. Die Konzentration der Nukleinsäure berechnet sich nach Gleichung 3:

$$c(\text{DNA}) = OD_{260} \cdot V \cdot F \quad (3)$$

$c(\text{DNA})$ – Konzentration der Nukleinsäure in $\mu\text{g mL}^{-1}$;

OD_{260} – Extinktion bei 260 nm;

V – Verdünnungsfaktor;

F – Umrechnungsfaktor, für doppelsträngige DNA ist dieser Faktor $50 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Die praktisch bestimmte Konzentration der EGFP-DNA nach der Beladung beträgt $78,5 \mu\text{g mL}^{-1}$, was 78,5 % der praktisch eingesetzten Menge entspricht. Die berechnete Molarität ist $2,2 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ($M_w = 3621,59 \text{ kg mol}^{-1}$). Es ist auch zu bemerken, dass die mittels UV-Vis-Spektroskopie bestimmte DNA-Menge durch die Anwesenheit von PEI in der Dispersion beeinflusst werden kann. Dadurch kann die praktische Beladung der Nanopartikel mit EGFP-DNA von der eingegebenen Beladung abweichen. Die Berechnungen der Partikelkonzentration unter der Annahme eines mittleren Radius von $r(\text{NP}) = 60 \cdot 10^{-9} \text{ m}$ ergeben, dass nach der Synthese 1 mL Dispersion $6,5 \cdot 10^{10}$ Calciumphosphat-Nanopartikel enthält und jedes Partikel mit ca. 200 EGFP-DNA-Molekülen beladen ist.

Die Transfektionseffizienz der DNA-beladenen Calciumphosphat-Nanopartikel wurde an HeLa- und MG-63-Zellen durch die Expression von grün fluoreszierendem Protein (EGFP) mittels Fluoreszenzmikroskopie ermittelt. Diese lässt sich berechnen, indem man die Anzahl der grün-fluoreszierenden Zellen durch die Gesamtanzahl der Zellen teilt. Im Vergleich zu den mit DNA-beladenen Silica-modifizierten Nanopartikeln wurde Lipofectamine 2000 als Vergleich für die Transfektion verwendet. Lipofectamine 2000 ist ein Mittel zur Transfektion auf der Basis eines kationischen Liposoms. Die Viabilität der Zellen nach der Transfektion wurde mit dem MTT-Test ermittelt.

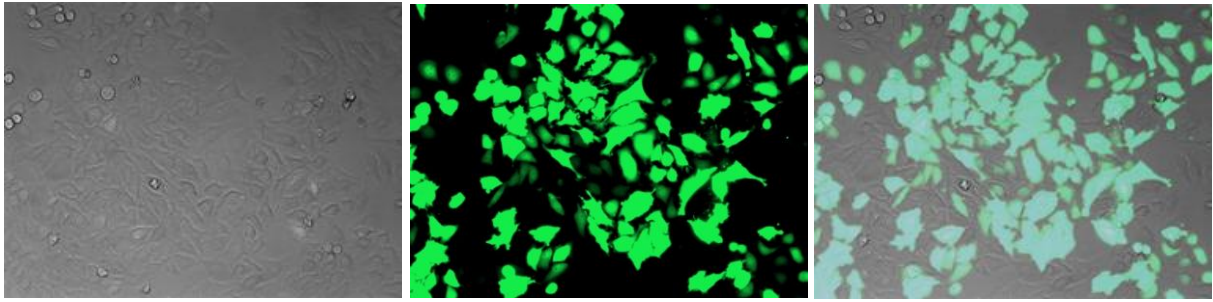


Abb. 64: Mikroskopische Aufnahmen von HeLa-Zellen nach der Transfektion mit EGFP-DNA-beladenen thioleffunktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln. *Links:* Lichtfeld, *Mitte:* Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme, *rechts:* Überlagerung der beiden Aufnahmen. Beispielfhaft sind mikroskopische Aufnahmen nach der Transfektion mit einer Partikelkonzentration gezeigt. Die gegebene Partikelkonzentration beträgt $4,8 \cdot 10^9$ Nanopartikel pro $2,5 \cdot 10^4$ Zellen, was am Anfang des Experiments einer durchschnittlichen Anzahl von $1,9 \cdot 10^5$ Nanopartikeln pro Zelle entspricht.

Zur Transfektion der HeLa-Zellen wurden unterschiedliche Volumina des Kolloids zugegeben, um den Zusammenhang zwischen der Transfektionseffizienz und der Viabilität der Zellen zu bestimmen. In Abbildung 64 sind repräsentative Aufnahmen der Durchlicht- und Fluoreszenzmikroskopie zur Ermittlung der Transfektionseffizienz an HeLa-Zellen für 40 μL ($4,8 \cdot 10^9$ Calciumphosphat-Nanopartikel pro Well) des gegebenen Kolloids gezeigt.

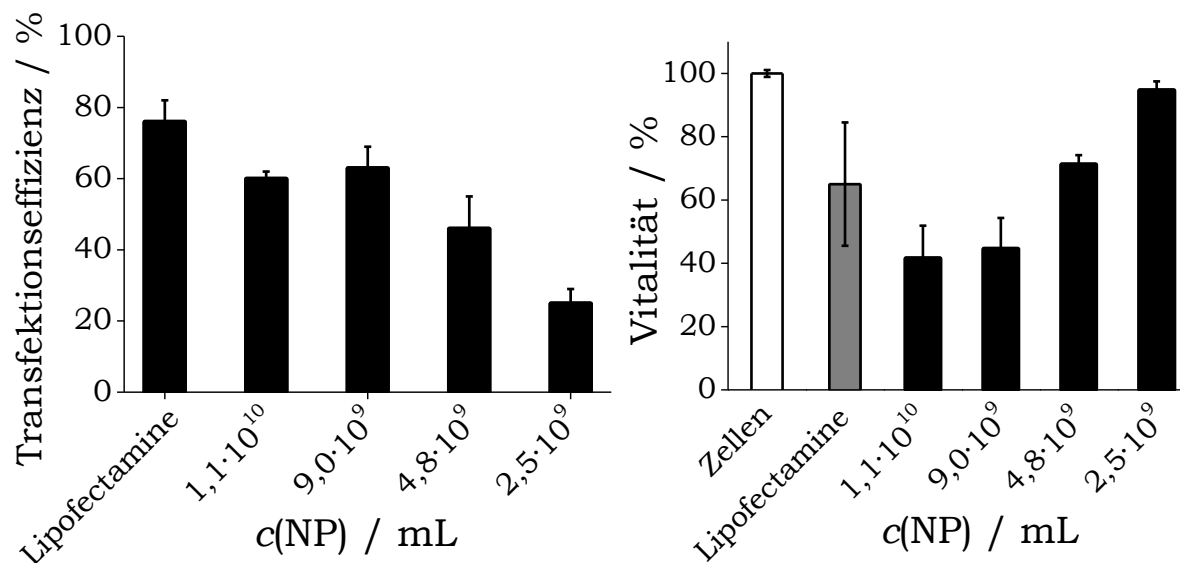


Abb. 65: Transfektionseffizienz (*links*) und MTT-Test (*rechts*) von HeLa-Zellen nach der Transfektion mit Lipofectamine und EGFP-DNA-beladenen thioolfunktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln in verschiedenen Partikelkonzentrationen.

Die Transfektionseffizienzen und Zellvitalitäten sind in Abbildung 65 gegenübergestellt. Die Transfektionswerte steigen von 25 % bis 60 % mit zunehmender Partikelkonzentration (Lipofectamine: 75 %). Andererseits verringert sich die Zellvitalität von 90 % auf 40 % (Lipofectamine: 65 %) mit zunehmender Konzentration der Partikel. Dieses Resultat lässt sich auf die Stabilisierung der Partikel mit PEI zurückführen. Die Gegenwart von PEI in DNA-beladenen Partikeln verbessert die Transfektion der Zellen, hat aber gleichzeitig auch eine toxische Wirkung.

Die gleichen Konzentrationen der DNA-beladenen Calciumphosphat-Nanopartikel wurden ebenfalls zur Transfektion der MG-63-Zellen (Osteoblasten-Zelllinie) verwendet.¹³⁶ Diese Zelllinie ist empfindlicher und im Vergleich zu HeLa-Zellen schwieriger zu transfizieren.

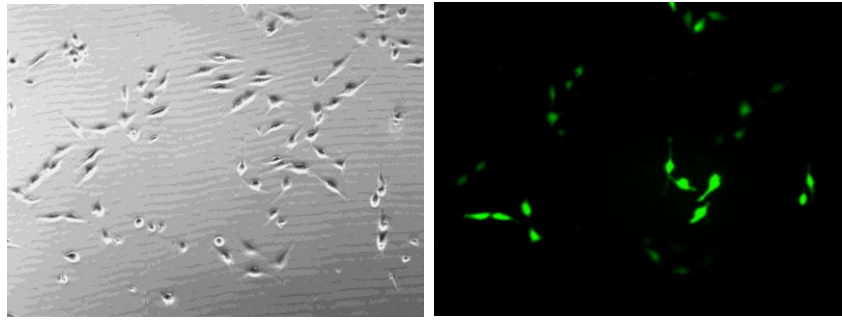


Abb. 66: Durchlicht- (*links*) und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen (*rechts*) von MG-63-Zellen nach der Transfektion mit EGFP-DNA-beladenen thioolfunktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln. Beispielhaft sind mikroskopische Aufnahmen nach der Transfektion mit einer Partikelkonzentration gezeigt. Die gegebene Partikelkonzentration beträgt $4,8 \cdot 10^9$ Nanopartikel pro $2,5 \cdot 10^4$ Zellen, was am Anfang des Experiments einer durchschnittlichen Anzahl von $1,9 \cdot 10^5$ Nanopartikeln pro Zelle entspricht.

Repräsentative durchlicht- und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von MG-63-Zellen nach der Transfektion mit einer Konzentration von $4,8 \cdot 10^9$ der EGFP-DNA-beladenen Calciumphosphat-Nanopartikel pro $2,5 \cdot 10^4$ Zellen sind in Abbildung 66 gezeigt. Schon eine Partikelkonzentration von $4,8 \cdot 10^9$ pro $2,5 \cdot 10^4$ Zellen zeigt einen sehr toxischen Effekt auf die MG-63-Zellen (40 % Vitalität) (Abb. 67). In höheren Partikelkonzentrationen bzw. $9,0 \cdot 10^9$ und $1,1 \cdot 10^{10}$ pro $2,5 \cdot 10^4$ Zellen sind alle Zellen tot. Trotz der festgestellten Toxizität des Trägersystems zeigt die niedrigste getestete Partikelkonzentration von $2,5 \cdot 10^9$ pro $2,5 \cdot 10^4$ Zellen eine befriedigende Transfektionseffizienz von 20 % und eine Vitalität von 85 %.

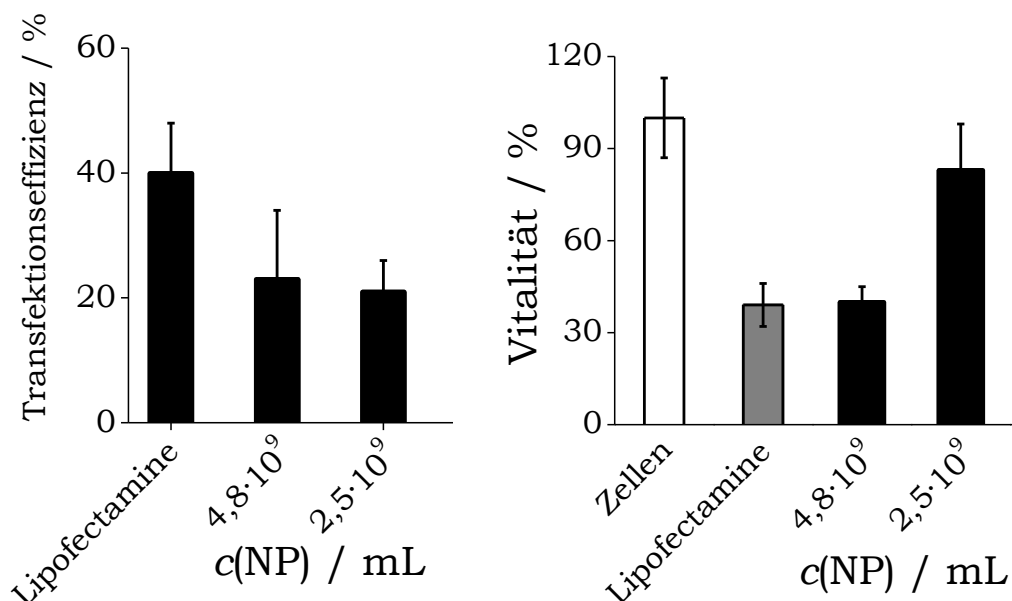


Abb. 67: Transfektionseffizienz (*links*) und MTT-Test (*rechts*) von MG-63-Zellen nach der Transfektion mit Lipofectamine und EGFP-DNA-beladenen thiofunktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln in verschiedenen Partikelkonzentrationen.

Die dargestellten Transfektionsergebnisse zeigen, dass HeLa- und MG-63-Zellen mit EGFP-DNA-beladenen thiofunktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln erfolgreich transfiziert werden können. Die erhaltenen Transfektionseffizienzen und Vitalitäten sind stark von der Partikelkonzentration und der Zelllinie abhängig, aber bei optimierten Bedingungen kann das untersuchte Trägersystem zur Transfektion eingesetzt werden.

Diese Zelleexperimente wurden von Frau M.Sc. S. Chernousova, Anorganische Chemie, Universität Duisburg-Essen, durchgeführt.

3.6 Flagellin-beladene Nanopartikel zur *in vitro*- und *in vivo*-Aktivierung der Immunantwort

Die Impfung ist der beste und effektivste Weg zur Prävention von Infektionskrankheiten. Zur Erzeugung einer aktiven Immunität werden hauptsächlich Impfstoffe (Vakzine) verabreicht, die abgetötete oder lebende attenuierte (abgeschwächte) Erreger und sogenannte Untereinheit-Vakzine mit gereinigten Bestandteilen aus Infektionserregern enthalten. Gereinigte oder rekombinante Untereinheit-Impfstoffe sind allerdings oft schwach immunogen und erfordern zusätzliche Komponenten, die auf Antikörpern und Effektorfunktionen von T-Zellen basieren und eine schützende Immunität stimulieren. Diese zusätzlichen Komponenten, sogenannte Adjuvantien, verbessern die Immunogenität von Impfantigenen.¹³⁷⁻¹³⁹ Die aktuellen Literaturdaten deuten darauf hin, dass die meisten Adjuvantien eher durch den Eingriff von Komponenten des angeborenen Immunsystems zur Verbesserung von B- und T-Zellantworten führen als durch eine direkte Wirkung auf die Lymphozyten.¹³⁸

Der gemeinsame Transport von Antigenen und Adjuvantien zu Zellen des angeborenen Immunsystems kann durch ein geeignetes Trägersystem erfolgen. Zu den vielversprechenden Impfstoffträgern gehören biologisch abbaubare Nanopartikel, die Antigene in einer Matrix aus Polymeren oder anorganischen Materialien enthalten. Die biologisch abbaubaren Nanopartikel werden aus unterschiedlichen, oft kombinierten Materialien wie Chitosan, PLGA oder Calciumphosphat hergestellt.^{45, 140, 141}

3.6.1 Flagellin zur Aktivierung von TLR5 und NLRC4

Flagellin ist ein wichtiges Strukturprotein der Flagellen-Filamente von Bakterien, und eine Art von Pathogen-assoziierten molekularen Mustern (*pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs).^{142, 143} PAMPs werden durch Mustererkennungsrezeptoren (*pattern-recognition receptors*, PRRs) erkannt, die als Teil der angeborenen Immunantwort bei Immunzellen wie Makropha-

gen, Monozyten, dendritischen Zellen (DCs) sowie natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) weit verbreitet sind.¹⁴⁴ Eine wichtige Untergruppe der PRRs stellen die membranständigen Toll-like Rezeptoren (*toll-like receptors*, TLRs) dar. Sie erkennen spezifische Strukturen von pathogenen Mikroorganismen, wie z.B. Lipopolysaccharide (LPS), Lipopeptide, Virus-assoziierte Nukleinsäuren (CpG oder Poly (I:C)) oder Flagellin, und regulieren die Aktivierung des angeborenen und des adaptiven Immunsystems. Zu einer anderen Untergruppe der zytosolischen signalgebenden PRRs zählen die Nod-like Rezeptoren (NLRs).¹⁴⁵⁻¹⁴⁷ Das Flagellin-Protein wird primär auf der Zelloberfläche durch TLR5 erkannt, welcher für seine spezifische Erkennung von Flagellin bekannt ist. Dies führt zu einer schnellen Induktion der angeborenen Immunantwort durch die Sekretion von Zytokinen und Chemokinen wie NF- κ B, TNF, IL-6 und IL-12 und führt auf diese Weise zur Modulation der adaptiven Immunantwort.^{148, 149} Nach dem Eindringen ins Zytosol der Makrophage erfolgt die Erkennung von intrazellulärem Flagellin durch den Nod-like Rezeptor C4 (NLRC4). Wichtigster Vertreter dieser Familie ist Ipaf (*ICE protease activating factor*). Dieser Rezeptor bindet Flagellin und führt zu einer TLR5-unabhängigen Aktivierung von Caspase-1, welche durch eine Spaltung von pro-IL-1 β und pro-IL-18 zu einer Freisetzung von IL-1 β und IL-18 führt.^{142, 150, 151} Da die beiden TLR5- und NLRC4-Signalwege eine wichtige Rolle in der Immunmodulation spielen, wird Flagellin als potenzielles Adjuvans angesehen.^{152, 153}

Die letzten Arbeiten von Yan *et al.* ergaben, dass das Flagellin-Protein die IgA- und IgG-Generation der Schleimhaut potentiell vorteilhaft induzieren kann.¹⁵³⁻¹⁵⁵ Andererseits wurde die Anwendung der Calciumphosphat-Nanopartikel als effizientes Trägersystem zum Transport verschiedener Biomoleküle wie DNA, RNA, Peptide und Proteine durch die Zellmembran von Sokolova *et al.* gezeigt.⁶⁹ Im Weiteren führte die Beladung der Calciumphosphat-Nanopartikel mit dem Adjuvans CpG und einen Antigen zu einer selektiven Stimulation des Immunsystems.^{8, 14, 45} Um eine weitere Aktivierung des angeborenen Immunsystems mit Flagellin erreichen zu können, wurden die Silica-modifizierten Calciumphosphat-Nanopartikel mit Flagellin beladen und die Stimulation der Zellen mit Flagellin-beladenen Nanoparti-

keln untersucht. Eine schematische Darstellung der verschiedenen Interaktionen von Zellrezeptoren mit Flagellin-beladenen Silica-modifizierten Calciumphosphat-Nanopartikeln, die zu der Sekretion von Zytokinen führt, ist in Abbildung 68 zusammenfassend gezeigt.

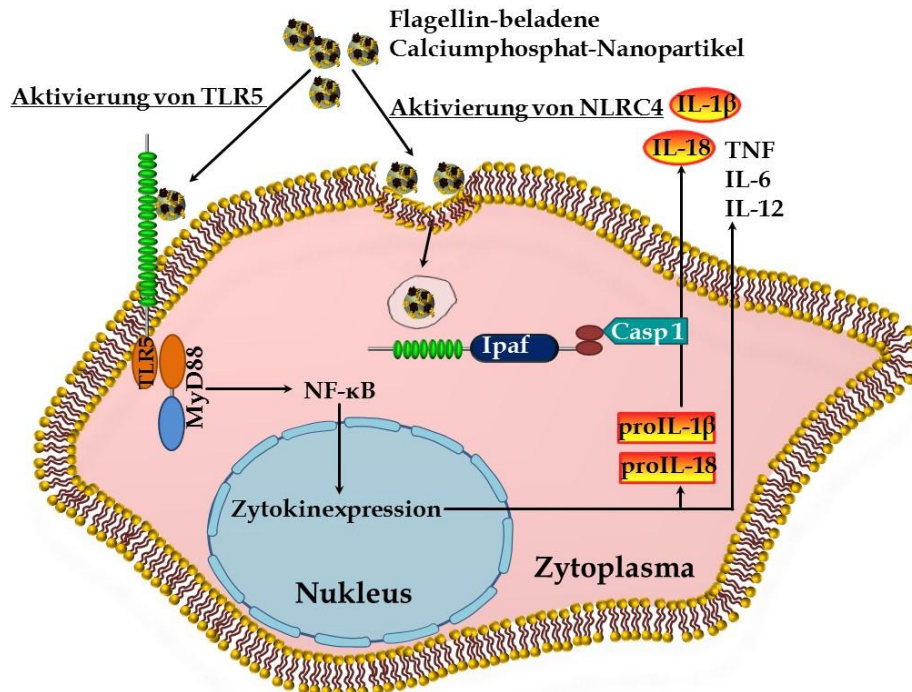


Abb. 68: Schematische Darstellung der Aktivierung von TLR5 und NLRC4 in Makrophagen durch Flagellin-beladene Calciumphosphat-Nanopartikel. Flagellin kann durch extrazelluläre (TLR5) oder zytosolische Rezeptoren (Ipaf/NLRC4) erkannt werden. TLR5 aktiviert über das Adaptorprotein MyD88 die Freisetzung von NF-κB, TNF, IL-6 und IL-12. Bei Ipaf kommt es zur Aktivierung von Caspase-1, welches zur Freisetzung von IL-1β und IL-18 führt.

Die physikochemischen Eigenschaften und die *in vitro*-/*in vivo*-immunmodulierende Wirkung von Flagellin-beladenen Silica-modifizierten Calciumphosphat-Nanopartikeln werden in den nächsten Kapiteln diskutiert.

3.6.2 Charakterisierung der Flagellin-beladenen Nanopartikel

Die Polyethylenimin-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikel wurden mit Flagellin-Protein beladen und nachträglich mit einer Silica-Schale modifiziert, um das verkapselte Protein zu schützen (Abb. 69).

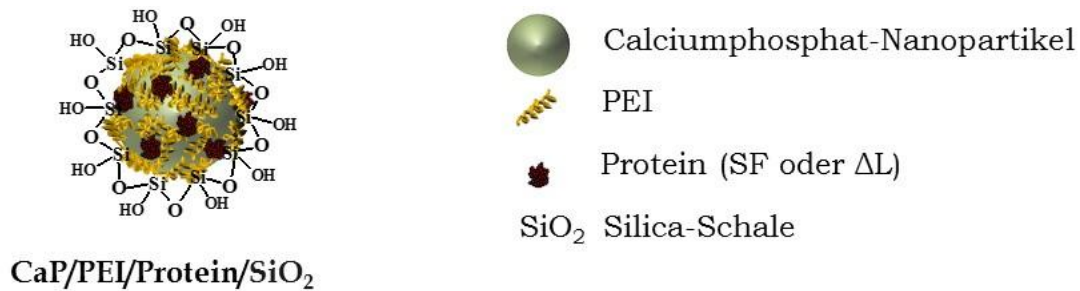


Abb. 69: Schematische Darstellung zur Beladung der Silica-modifizierten Calciumphosphat-Nanopartikel mit Proteinen (SF-Flagellin oder inaktivem ΔL-Flagellin-Mutant).

Die Morphologie und Partikelgrößenverteilung der unbeladenen und Flagellin-beladenen Calciumphosphat-Nanopartikel wurden mittels DLS und REM überprüft. Die hydrodynamischen Durchmesser der synthetisierten Nanopartikel liegen zwischen 200 nm und 380 nm, je nach Partikelart (Abb. 70).

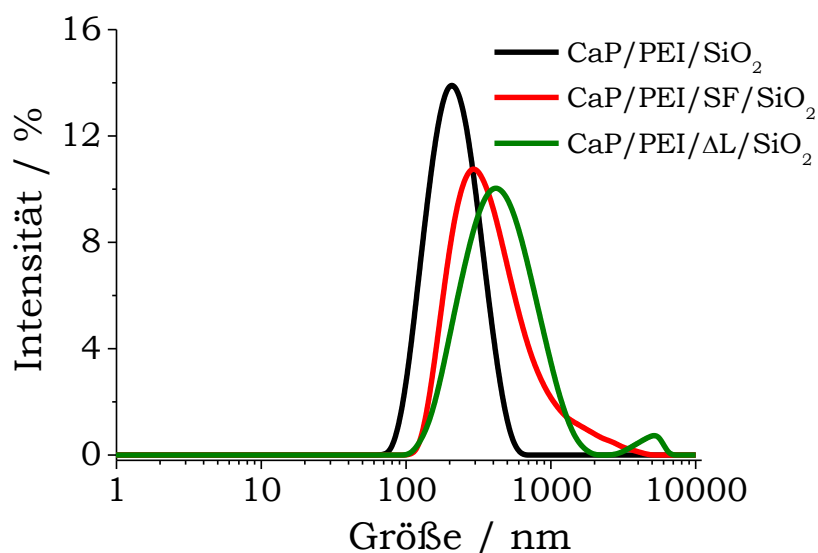


Abb. 70: Partikelgrößenverteilung (DLS) der Silica-modifizierten Calciumphosphat-Nanopartikel ohne Flagellin, beladen mit SF-Flagellin oder dem inaktiven Δ L-Flagellin-Mutant.

Die Calciumphosphat-Nanopartikel ohne Protein besitzen einen hydrodynamischen Durchmesser von 194 nm mit einem PDI von 0,15. Nach der Beladung der Partikel mit einem Protein (SF oder Δ L als Negativkontrolle) werden die mittleren hydrodynamischen Durchmesser deutlich größer, nämlich 330 nm und 385 nm. Die Polydispersitätsindizes von 0,21-0,26 deuten auf keine starke Agglomeration der SF- oder Δ L-beladenen Calciumphosphat-Nanopartikel hin. Das Zetapotential zeigt eine Ladungsänderung von +22 mV nach +10 mV von unbeladenen zu Protein-beladenen Nanopartikeln (Tabelle 8).

Tabelle 8: Kolloidchemische Parameter der Protein-beladenen Silica-modifizierten Calciumphosphat-Nanopartikel.

Probe	Durchmesser in nm (DLS)	PDI	Zetapotential in mV
CaP/PEI/SiO ₂	194	0,15	22±5
CaP/PEI/SF/SiO ₂	330	0,21	9±4
CaP/PEI/ΔL/SiO ₂	385	0,26	10±4

In Abbildung 71 sind REM-Aufnahmen der SF- bzw. Δ L-beladenen Partikel dargestellt. Die Partikel sind rund geformt und besitzen einen Durchmesser von 60-100 nm. Der mikroskopisch ermittelte Durchmesser zeigt starke Abweichungen zum hydrodynamischen Durchmesser.

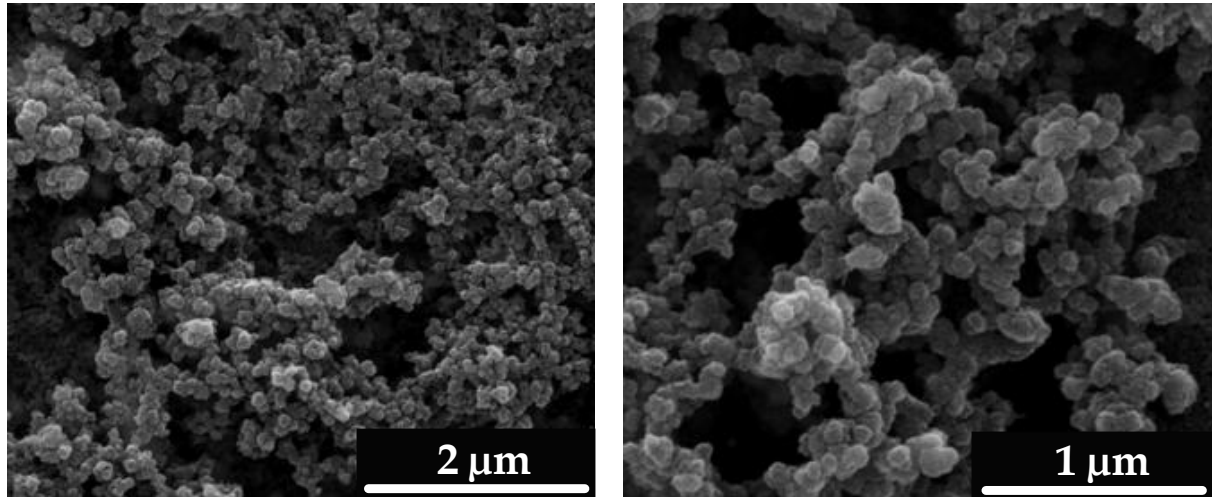


Abb. 71: REM-Aufnahmen der SF-Flagellin- (A) sowie mit dem inaktiven Δ L-Flagellin-Mutant- (B) beladenen Silica-modifizierten Calciumphosphat-Nanopartikel.

3.6.3 *In vitro* Aktivierung der Immunantwort

Um die immunmodulierende Funktion der Flagellin-beladenen Silica-modifizierten Calciumphosphat-Nanopartikel zu testen, wurde geprüft, ob die Partikel die Produktion der proinflammatorischen Zytokine stimulieren können. Da TLR5 der primäre Rezeptor für die Erkennung von Flagellin ist, wurden die Stimulationsversuche mit Flagellin-beladenen Calciumphosphat-Nanopartikeln in Caco-2-Zellen durchgeführt.¹⁵⁰ Die erhaltenen Ergebnisse der Stimulationsversuche sind in Abbildung 72 dargestellt. SF-beladene Calciumphosphat-Nanopartikel induzieren eine IL-8 Antwort, die vergleichbar mit dem gelösten Flagellin ist. Im Gegensatz dazu gibt es keine Produktion von IL-8 nach der Stimulation der Zellen mit Δ L-beladenen Nanopartikeln oder dem gelösten inaktiven Δ L-Flagellin-Mutant.

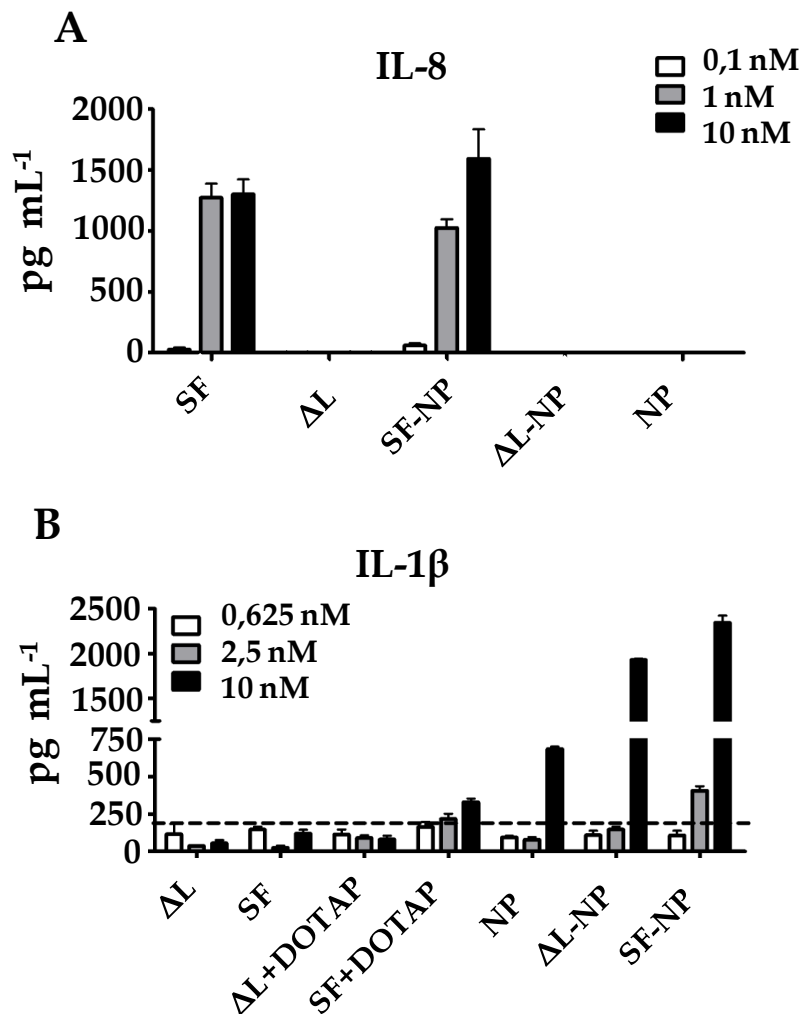


Abb. 72: Produktion von proinflammatorischen Zytokinen nach Stimulation der Zellen mit Protein-beladenen Calciumphosphat-Nanopartikeln *in vitro*. A: Caco-2-Zellen wurden mit Flagellin-beladenen Calciumphosphat-Nanopartikeln oder gereinigtem Flagellin für 6 Stunden stimuliert. Die zellfreien Überstände wurden mittels ELISA auf die Produktion von IL-8 untersucht. B: Knochenmarksmakrophagen (*bone marrow-derived macrophages*, BMDM) wurden erst 3 Stunden mit 50 ng mL⁻¹ LPS pre-inkubiert und danach mit Flagellin-beladenen Calciumphosphat-Nanopartikeln oder gereinigtem Flagellin für 6 Stunden stimuliert. Die Produktion von IL-1β wurde in zellfreien Überständen mittels ELISA gemessen. SF: Flagellin; ΔL: Inaktiv Flagellin-Mutant; LPS: Lipopolysaccharide; DOTAP: N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium-methylsulfat; SF-NP: Flagellin-beladene Calciumphosphat-Nanopartikel; ΔL-NP: Mit dem inaktiven Flagellin-Mutant-beladene Calciumphosphat-Nanopartikel; SF+DOTAP: Flagellin mit dem Transfektionsmittel DOTAP; ΔL+DOTAP: Inaktiv Flagellin-Mutant mit dem Transfektionsmittel DOTAP; NP: Calciumphosphat-Nanopartikel ohne Protein.

Im Folgenden wurde untersucht, ob SF-beladene Silica-modifizierte Calciumphosphat-Nanopartikel die Produktion von IL-1 β in murinen Knochenmarksmakrophagen induzieren können. Für ein detektierbares IL-1 β Signal wurden die Mausemakrophagen mit LPS vorstimuliert. Die Vorstimulation zur Produktion einer ausreichenden pro-IL-1 β -Synthese in murinen Makrophagen wurde bereits für viele PAMP gezeigt und steht im Einklang mit der Literatur.¹⁵⁶ Die Produktion von IL-1 β nach der Stimulation von murinen Makrophagen mit Flagellin-beladenen Calciumphosphat-Nanopartikeln wurde anschließend mittels ELISA untersucht (Abb. 72B). Durch den Einsatz des liposomalen Transfektionsmittels DOTAP induzierten alle getesteten Konzentrationen von SF die IL-1 β -Produktion in Makrophagen in einem geringen Maß. Andererseits entstand eine deutlich höhere IL-1 β -Produktion von murinen Makrophagen nach der Stimulation mit SF-beladenen Calciumphosphat-Nanopartikeln. Des Weiteren lag die IL-1 β -Ausschüttung nach der Stimulation mit Δ L und DOTAP nicht über dem Niveau der Kontrollzellen. Die unbeladenen oder Δ L-beladenen Nanopartikel ergaben auch eine Expression von IL-1 β bei der höchsten eingesetzten Konzentration. Dies deutet auf eine allgemeine Wirkung der Stimulation von Makrophagen, möglicherweise durch gelöste Calcium-Ionen nach der Aufnahme von Nanopartikeln oder durch den Stabilisator Polyethylenimin, hin.

3.6.4 *In vivo* Aktivierung der Immunantwort

Im Weiteren wurden die Auswirkungen von Flagellin-beladenen Silica-modifizierten Calciumphosphat-Nanopartikeln auf die angeborene Immunität *in vivo* getestet. C57BL/6-Mäuse wurden intraperitoneal (i.p.) immunisiert und das Serum sowie die peritoneale Lavage-Flüssigkeit (PLF) 4 Stunden nach der Injektion der Partikel gesammelt. Die Produktion von IL-6 im Serum und PLF wurde mittels ELISA bestimmt (Abb. 73). Die SF-beladenen Calciumphosphat-Nanopartikel induzieren die Produktion von IL-6 im Serum effizienter im Vergleich zum gelösten SF-Protein. Auch die Immunisierung von Mäusen mit Δ L-beladenen Calciumphosphat-Nanopartikeln führt zur Steigerung der IL-6-Produktion im Serum (Abb. 73A). Interessanterweise gibt es keine signifikanten Unterschiede zwischen der Produktion von IL-6 in PLF nach der Immunisierung der Mäuse mit SF- oder Δ L-beladenen Silica-modifizierten Calciumphosphat-Nanopartikeln (Abb. 73B). In PLF führen auch die Partikel ohne Protein zu einer Zunahme der IL-6-Produktion, was wiederum auf eine Wirkung der funktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikel hindeutet.

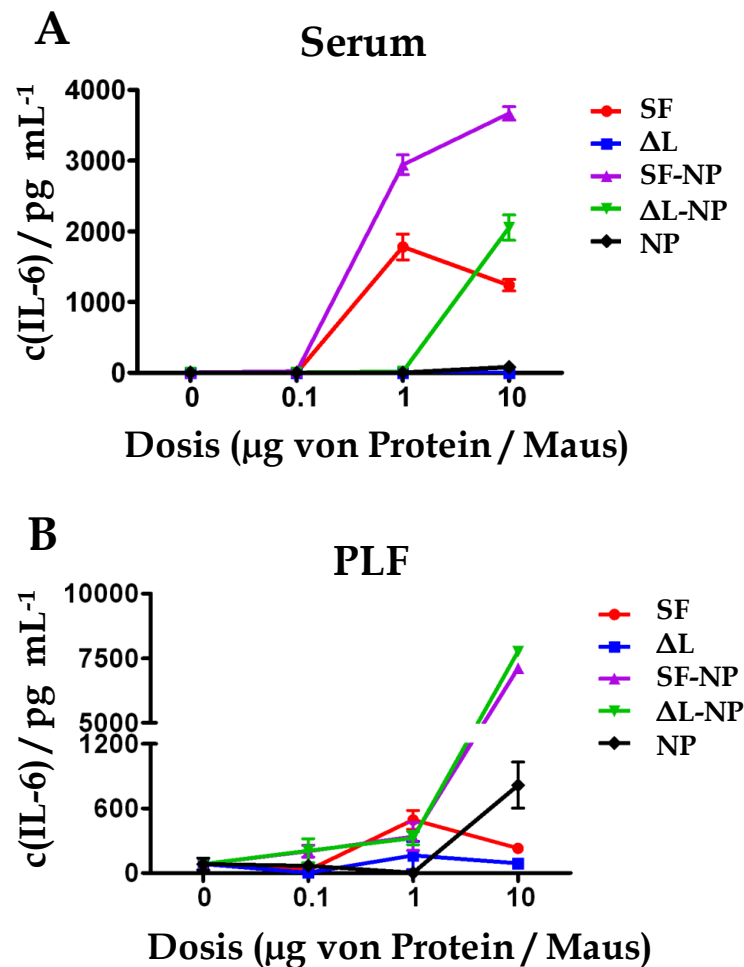


Abb. 73: Produktion der proinflammatorischen Zytokine nach der Behandlung der Mäuse mit Protein-beladenen Calciumphosphat-Nanopartikeln *in vivo*. C57BL/6-Mäuse wurden i.p. immunisiert. Das gesammelte Serum (A) und die peritoneale Lavage-Flüssigkeit (PLF) (B) wurden mittels ELISA auf die Produktion von IL-6 untersucht. SF: Flagellin; ΔL: Inaktiv Flagellin-Mutant; SF-NP: Flagellin-beladene Calciumphosphat-Nanopartikel; ΔL-NP: Mit dem inaktiven Flagellin-Mutant-beladene Calciumphosphat-Nanopartikel; NP: Calciumphosphat-Nanopartikel ohne Protein.

Zusammenfassend zeigen die *in vitro*- und *in vivo*-Ergebnisse, dass Flagellin-beladene Silica-modifizierte Calciumphosphat-Nanopartikel die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen induzieren können. Zudem induzieren Protein-beladene Partikel eine wesentlich höhere Expression von Zytokinen im Vergleich zu dem gelösten Flagellin-Protein in der gleichen Konzentration. Daher können Flagellin-beladene Nanopartikel effizient die angeborene Immunantwort stimulieren.

Wie aus der Literatur bekannt ist, knüpfen die proinflammatorischen Zytokine IL-8 und IL-6 einen wichtigen Zusammenhang zwischen der angeborenen und der erworbenen Immunität.¹⁵⁷ In der initialen Phase der Aktivierung des Immunsystems werden diese Zytokine durch Antigen-präsentierende Zellen (APC) sezerniert, die danach an einer weiteren Aktivierung von T- oder B-Zellen beteiligt sind. Die früheren Arbeiten von Yan *et al.* zeigten, dass Flagellin-Protein durch die Aktivierung von TLR5 die Produktion von Zytokinen wie IL-8, IL-6 und IFN- γ induzieren kann und dadurch als ein neues potenzielles Adjuvans betrachtet werden kann.¹⁵³ Der wichtigste Vorteil ist die Induktion von mukosalem IgA, was ein essenzieller Schutzfaktor gegen lokale Virusinfektionen der Schleimhautoberflächen ist.^{158, 159} Die Einkapselung von Flagellin in Silica-modifizierten Calciumphosphat-Nanopartikeln induziert nicht nur die Sekretion der Zytokine des TLR5-Signalwegs, sondern führt auch zur Produktion von intrazellulären Zytokinen. Ein typischer Vertreter dieser Familie (IL-1 β) wurde nach der *in vitro*-Stimulation von murinen Makrophagen mit ELISA bestimmt. IL-1 β ist ein leistungsfähiger Immunmodulator und wurde als ein Adjuvans in den vergangenen Jahrzehnten betrachtet. Somit stellen Flagellin-beladene Silica-modifizierte Calciumphosphat-Nanopartikel eine neue potentielle Art von Adjuvantien bei gleichzeitiger Anwendung von Flagellin und Nanopartikeln bereit, insbesondere, wenn das betrachtete Trägersystem noch mit einem Antigen^{14, 45} beladen wird und gezielt an die spezifischen Antigen-präsentierenden Zellen bindet.¹⁰⁵

Die *in vitro*- und *in vivo*-Untersuchungen wurden von den Kooperationspartnern M. Zhong, E. Zhang, J. Yang, W. Li und Y. Yang, Wuhan Institut für Virologie, Volksrepublik China, AG Prof. H. Yan, durchgeführt.

3.7 Konjugation der Nanopartikel mit Antikörpern zur selektiven Zelladressierung

Die bisherigen Experimente zeigen, dass Silica-modifizierte Calciumphosphat-Nanopartikel breite Funktionalisierungsmöglichkeiten bieten, bzw. eine Konjugation mit Farbstoffen oder Beladung mit Biomolekülen ermöglichen. Um die Effektivität und Selektivität dieses Nanopartikelsystems zu steigern, soll eine weitere Spezialisierung des Systems mit einer zielgerichteten Bindung durchgeführt werden. Dies ist möglich durch die Dekoration der Partikeloberfläche mit spezifischen Molekülen, z.B. mit Antikörpern, Proteinen, Zellpenetrierenden Peptiden oder Aptameren.¹⁶⁰⁻¹⁶⁴

In diesem Kapitel wird die Konjugation der Silica-modifizierten Calciumphosphat-Nanopartikel mit Antikörpern betrachtet.

3.7.1 Moleküle zum Targeting

Die Konjugation der Partikel mit zellspezifischen Molekülen hat einen neuen Fortschritt in die Molekular- und Zellbiologie eingeführt, z.B. eine Verbesserung des *in vivo*-Gentransfers, der klinischen Diagnose, der Tumordiagnostik und ein Rezeptor-gezieltes Targeting.¹⁶⁴⁻¹⁶⁸ Die Konjugation der verschiedenen zellspezifischen Moleküle an die Nanopartikel erweitert ihre Einsatzbereiche und bietet ihnen neue oder verbesserte Eigenschaften. Eine Reihe von Molekülen kann mit den Nanopartikeln konjugiert werden:

1) Proteine, z.B. Antikörper,^{48, 99} Antikörperfragmente,¹⁶⁹ BSA, Transferrin,¹⁷⁰ Lektine,¹⁷¹ Cytokine, Fibrinogen¹⁷² und Thrombin. Die Proteine werden durch die spezifischen Rezeptoren auf der Oberfläche der Tumorzellen erkannt. Dadurch wird die spezifische Aufnahme des konjugierten nanopartikulären Systems erhöht. Zudem interferieren die Proteine mit den Signaltransduktionswegen und regulieren die Protoonkogene, die an der Proliferation der Tumorzellen beteiligt sind.¹⁷³

2) Aptamere, z.B. ssDNA, ssRNA¹⁷⁴ sowie siRNA¹⁷⁵, die eine Vielzahl von exprimierten Molekülen (Proteine, Phospholipide, Zucker, Nukleinsäuren) mit hoher Affinität und Spezifität erkennen.¹⁶³

3) Peptide, z.B. RGD,¹⁷⁶ und LHRD, die sehr spezifisch und mit hoher Affinität an entsprechende Rezeptoren binden.¹⁷⁷

4) Folsäure (niedermolekulare Moleküle). Die Folsäure zeigt eine hohe Spezifität bei der Erkennung der Folsäure-Rezeptoren, die in vielen Arten von Tumorzellen überexprimiert werden.¹⁶³

5) Polysaccharide, z.B. Hyaluronsäure, Chitosan, Dextran und Heparin, die ebenfalls an entsprechenden überexprimierten Rezeptoren auf der Oberfläche der Tumorzellen binden.¹⁶¹

Da für die Konjugation der entwickelten Silica-modifizierten Calciumphosphat-Nanopartikel Antikörper ausgewählt wurden, werden deren Eigenschaften hier näher diskutiert.

Antikörper

Immunoglobuline oder Antikörper sind Proteine aus der Klasse der Globuline, die in Wirbeltieren als Reaktion auf bestimmte Stoffe, so genannte Antigene, gebildet werden. Die Antikörper haben eine sehr ähnliche Struktur in einer Y-Form des bifunktionellen Moleküls mit zwei identischen Domänen für die Antigenerkennung (F_{ab}-Fragment) und einer Domäne mit Effektorfunktion (F_c-Fragment) (Abb. 74). Die Antigen-bindende Region ist sehr spezifisch und variiert je nach Antikörper.¹⁶⁰

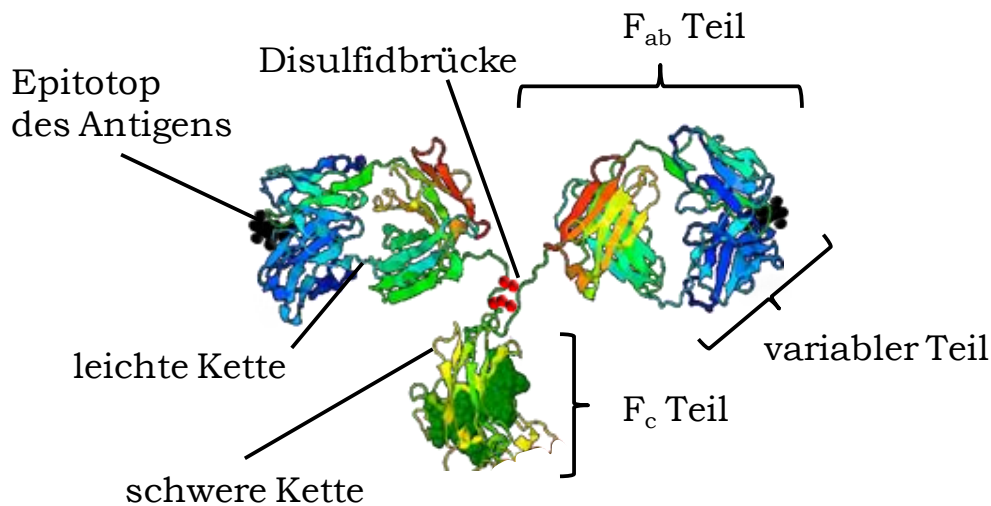


Abb. 74: Schematische Struktur eines IgG-Antikörper-Moleküls. Das Antikörper-Molekül besteht aus zwei identischen schweren Ketten und zwei identischen leichten Ketten, die durch kovalente Disulfidbrücken miteinander zu einer Y-förmigen Struktur verknüpft sind.

Jeder Antikörper besteht aus vier Polypeptidketten, zwei identischen leichten (L) Ketten (jeweils etwa 220 Aminosäuren, 24-25 kDa) und zwei identischen schweren (H) Ketten (jeweils etwa 440 Aminosäuren, 55-70 kDa), die durch kovalente Disulfidbrücken miteinander verknüpft sind. Die Art des Immunglobulins ist von den konstanten Teilen der schweren Ketten abhängig. Daher existieren bei den meisten Wirbeltieren fünf Klassen oder Isotypen von Immunglobulinen (IgA, IgD, IgE, IgG, IgM).^{160, 178, 179}

3.7.2 Konjugationsmöglichkeiten

Die häufigsten Konjugationsverfahren der Nanopartikel mit Molekülen sind die direkte Konjugation, die Konjugation mittels Crosslinker, physikalische Wechselwirkungen, die Klick-Chemie und Hybridisierungsmethoden.^{180, 181} Die Konjugation der Moleküle mit den Partikeln kann entweder durch eine Chemisorption oder durch die Verwendung von bifunktionellen Linkern erreicht werden. Eine Chemisorption der Biomoleküle, z.B. Antikörper, Proteine oder Peptide auf der Oberfläche von Partikeln (z.B. Gold oder Gold-enthaltene Nanopartikel, Quantenpunkte wie ZnS, CdS und CdSe/ZnS) wird

durch Cystein-Reste, die in Proteinen vorhanden sind, oder chemisch unter die Verwendung des Traut-Reagenzes (2-Iminoethanol) ausgeführt.^{182, 183} Ein bevorzugtes Verfahren in vielen Bereichen der Biochemie zur Kopplung der spezifischen Moleküle auf die Partikeloberfläche ist die Konjugation mit bifunktionellen Linkern.¹⁸⁴⁻¹⁸⁶ Crosslinker enthalten reaktionsfähige Endgruppen, die mit spezifischen funktionellen Gruppen (z.B. mit primären Aminen oder mit Sulfhydrylgruppen) der Proteine oder anderer Moleküle reagieren können. Nach den chemischen Eigenschaften unterscheidet man zwischen homobifunktionellen (mit gleichen reaktiven Gruppen) und heterobifunktionellen (mit unterschiedlichen reaktiven Gruppen) Crosslinkern. Der Nachteil der homobifunktionellen Linker liegt in der potentiellen Verbindung zweier benachbarter Gruppen entweder auf der Oberfläche der Nanopartikel oder auf dem Protein, was eine unerwünschte Vernetzung induzieren kann. Die heterobifunktionellen Crosslinker erlauben eine sequentielle Konjugation. Dadurch minimieren sich die Polymerisationsmöglichkeiten.¹⁸⁷ Zum Beispiel wird Sulfosuccinimidyl-4-(N-maleimido-methyl)-cyclohexan-1-carboxylat (Sulfo-SMCC) für eine Konjugation der Thiolgruppen der Biomoleküle mit Aminogruppen der funktionalisierten Nanopartikel oder umgekehrt eingesetzt.^{46, 47, 181, 188, 189} Die Konjugation der NH₂-Gruppen mit COOH-Gruppen wird mit dem heterobifunktionellen Crosslinker 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) durchgeführt.^{48, 182}

Das primäre Ziel der Konjugation von zellgerichteten Liganden mit den Nanopartikeln ist die Konjugation der Targeting-Einheit ohne Verlust ihrer Funktionalität. Die konjugierten nanopartikulären Systeme werden bereits als therapeutische Träger zum gezielten Targeting eingesetzt.^{48, 190, 191}

3.7.3 Passives Targeting

Passives Targeting oder physikalisches Targeting basiert auf der Akkumulation der Wirkstoffe oder der Wirkstoff-beladenen Nanopartikel in den Bereichen um den Tumor mit Hilfe undichter Blutgefäße (Abb. 75).¹⁹² Diese Undichtigkeit entsteht auf Grund der schnellen Proliferation von Endothelzellen und verringert die Anzahl an Perizyten. Dadurch entstehen große Poren in Blutgefäßen des Tumors mit einem Durchmesser von 100 nm bis zu einigen Hundert nm. Im Vergleich dazu haben normale Blutgefäße Porengrößen von 5-10 nm im Durchmesser.^{17, 193}

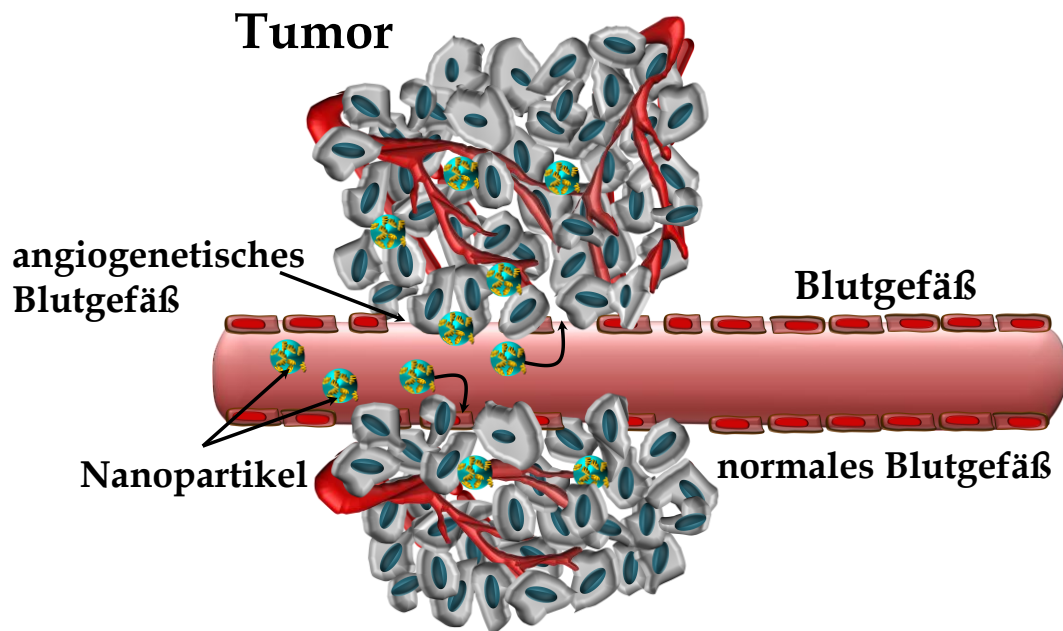


Abb. 75: Passives Targeting von Wirkstoff-beladenen Nanopartikeln zum Tumor durch den EPR-Effekt.

Die erhöhte vaskuläre Porosität mit einem dysfunktionellen Lymphgefäßsystem ermöglicht eine verbesserte Permeabilität und Retention (EPR-Effekt) in den schnell wachsenden Tumoren.^{194, 195} Der EPR-Effekt wird zur Erklärung der Akummulation von Wirkstoffen im Tumor in der Krebstherapie verwendet.^{173, 196} Für den erfolgreichen Transport von Wirkstoffen müssen die Nanopartikel einige Voraussetzungen erfüllen. Die Partikel müssen eine Größe zwischen 10 nm und 100 nm aufweisen, um eine Filtration durch die

Nieren oder durch die Leber zu vermeiden. Für eine effiziente Umgehung der renalen Elimination sollten die Partikel eine neutrale oder anionische Ladung besitzen.¹⁷³

3.7.4 Aktives Targeting

Im Gegensatz zum passiven Targeting beruht das aktive Targeting auf der Verwendung von bestimmten Liganden, die spezifisch an die (über-)exprimierten Rezeptoren der Zellen binden können.¹⁷³ Ein aktives Targeting des Trägersystems wird zur Erkennung bestimmter Zelltypen und zur Verbesserung der zellulären Aufnahme benutzt. Beispielsweise haben Kumar *et al.* die gerichtete Aufnahme von Transferrin-, anti-Claudin 4- und anti-Mesothelin-konjugierten Silica-Nanopartikeln an Pankreaskarzinom-Zellen untersucht. Biokonjugierte Nanopartikel zeigten höhere Aufnahme (>90 %) im Vergleich zu den nicht konjugierten Partikeln (ca. 56 %).¹⁹⁷ Farokhzad und Kollegen konnten einen 77-fachen Anstieg der intrazellulären Aufnahme der Aptamer-konjugierten PEGylierten PLA-Nanopartikel im Vergleich zu den nicht funktionalisierten Nanopartikeln in Prostatakarzinom-Zellen *in vitro* zeigen.¹⁹⁸ Liong *et al.* zeigten eine mehr als doppelt so große zelluläre Aufnahme der Folsäure-konjugierten mesostrukturierten Eisenoxid-dotierten Siliziumdioxid-Nanopartikel in PANC-1 Tumorzellen.¹⁹⁹ Die Arbeitsgruppe von Han *et al.* zeigte eine deutlich verbesserte therapeutische Wirksamkeit der RGD-konjugierten und siRNA-verkapselten Chitosan-Nanopartikel in präklinischen Ovarialkarzinom-Modellen.²⁰⁰ Trotz der vielen durchgeführten Untersuchungen wird der Vorteil des aktiven Targetings gegenüber dem passiven Targeting noch breit diskutiert.²⁰¹ Bevor die konjugierten Nanopartikel die gewünschten Zellen erreichen und an spezifischen oberflächigen Molekülen binden, kann das aktive Targeting durch eine Reihe anatomischer und physiologischer Barrieren limitiert werden.⁵ Zudem wechselwirken die Nanopartikel mit der biologischen Umgebung, was in der Folge zu einer Adsorption von Proteinen auf der Oberfläche der konjugierten Partikel führt und das aktive Targeting verhindert.^{25, 26, 202} Salvati *et al.*

zeigten einen Verlust der Targeting-Fähigkeiten von Transferrin-konjugierten Siliciumdioxid-Nanopartikeln nach der Adsorption der Protein-Korona auf der Partikeloberfläche.²⁴ Die Untersuchung des Targetings von konjugierten Nanopartikeln *in vitro* und *in vivo* ist wichtig für den Einsatz der nanopartikulären Konstrukte in klinischen Studien (Abb. 76).

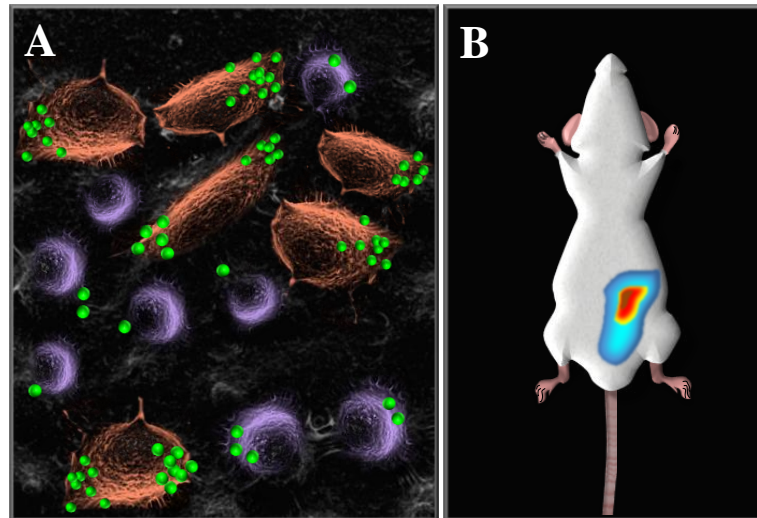


Abb. 76: *In vitro* (A) und *in vivo* (B) Untersuchungen der konjugierten Nanopartikel.

Trotz der vielen potenziellen Vorteile der funktionalisierten Nanopartikel ist nur ein relativ kleiner Anteil der Medikamente auf der Basis von nanopartikulären Trägersystemen für den klinischen Einsatz zugelassen.^{5, 196}

3.7.5 Konjugation der Nanopartikel mit Antikörpern

Die in diesem Kapitel dargestellte Konjugation der thiofunktionierten Calciumphosphat-Nanopartikel wurde durch eine chemische Modifikation der N-terminalen Aminogruppe von Antikörpern mit einem heterobifunktionellen Crosslinker Sulfo-SMCC erzeugt.^{46, 47} Die Entwicklung der Konjugationssynthese erfolgte mit einem FITC-markierten IgA-Modellantikörper. Ein möglicher Reaktionsverlauf des Konjugationsverfahrens ist in Abbildung 77 dargestellt. Dabei wird Sulfo-SMCC durch das primäre Amin nukleophil angegriffen, wobei Sulfo-N-hydroxysuccinimid als Nebenprodukt frei wird. In der Folge reagiert die Maleimidgruppe der aktivierten Antikörper mit der SH-Gruppe der funktionalisierten Nanopartikel unter Bildung einer stabilen Thioetherbrücke.

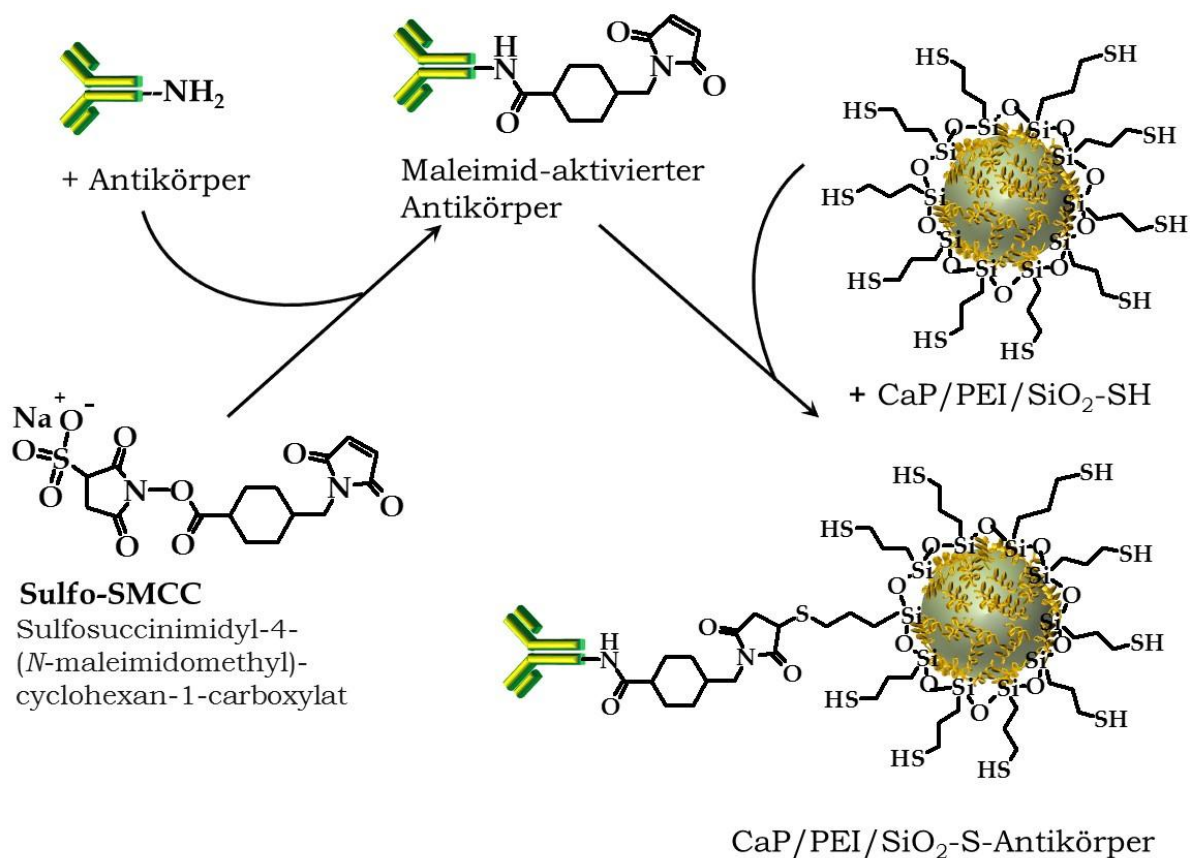


Abb. 77: Die Konjugation von thiofunktionierten Calciumphosphat-Nanopartikeln mit einem Antikörper.

Die Aufreinigung der Antikörper-konjugierten Nanopartikel von Nebenprodukten und freien Antikörpern erfolgte mittels Gelfiltration. Dies ist ein Verfahren, bei dem die Fraktionierung nach der Größe erfolgt. Die Gelfiltration hat unter den anderen chromatographischen Methoden eine Sonderstellung, da die Proteine keine Interaktion mit der stationären Phase eingehen. Die Auftrennung erfolgt dadurch, dass kleine Moleküle in die Poren der Matrix-Partikel diffundieren können. Dieser Effekt führt dazu, dass die größeren Partikel zuerst eluieren und die freien, kleineren Komponenten danach.²⁰³⁻²⁰⁵ Die eluierten Fraktionen, jeweils 300 µL, wurden nach der Sephadex-Säule gesammelt und jeweils mittels REM und Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Diese Fraktionen werden im Weiteren von 1 bis 10 durchnummeriert. Einen Eindruck der Partikelgrößen jeder Fraktion sollen die in Abbildung 78 gezeigten REM-Aufnahmen vermitteln. In den ersten vier REM-Aufnahmen ist zu erkennen, dass keine Partikel in den Fraktionen vorhanden sind. Ab der fünften Fraktion beginnen die Partikel zu eluieren. In Fraktion 6 ist eine typisch sphärische Morphologie und Größe von 70 nm bis 100 nm im Durchmesser der Calciumphosphat-Nanopartikel zu erkennen. Partikel mit einer kugelförmigen Morphologie sind in den Fraktionen von 5 bis 10 erkennbar. Jedoch ist eine starke Vernetzung der Partikel mit der organischen Matrix in Fraktion 7 zu verzeichnen, welche in Fraktion 8 wiederum schwächer wird. In Fraktion 9 und 10 eluieren die kleinsten Nanopartikel mit dem Durchmesser von 40 nm bis 60 nm.

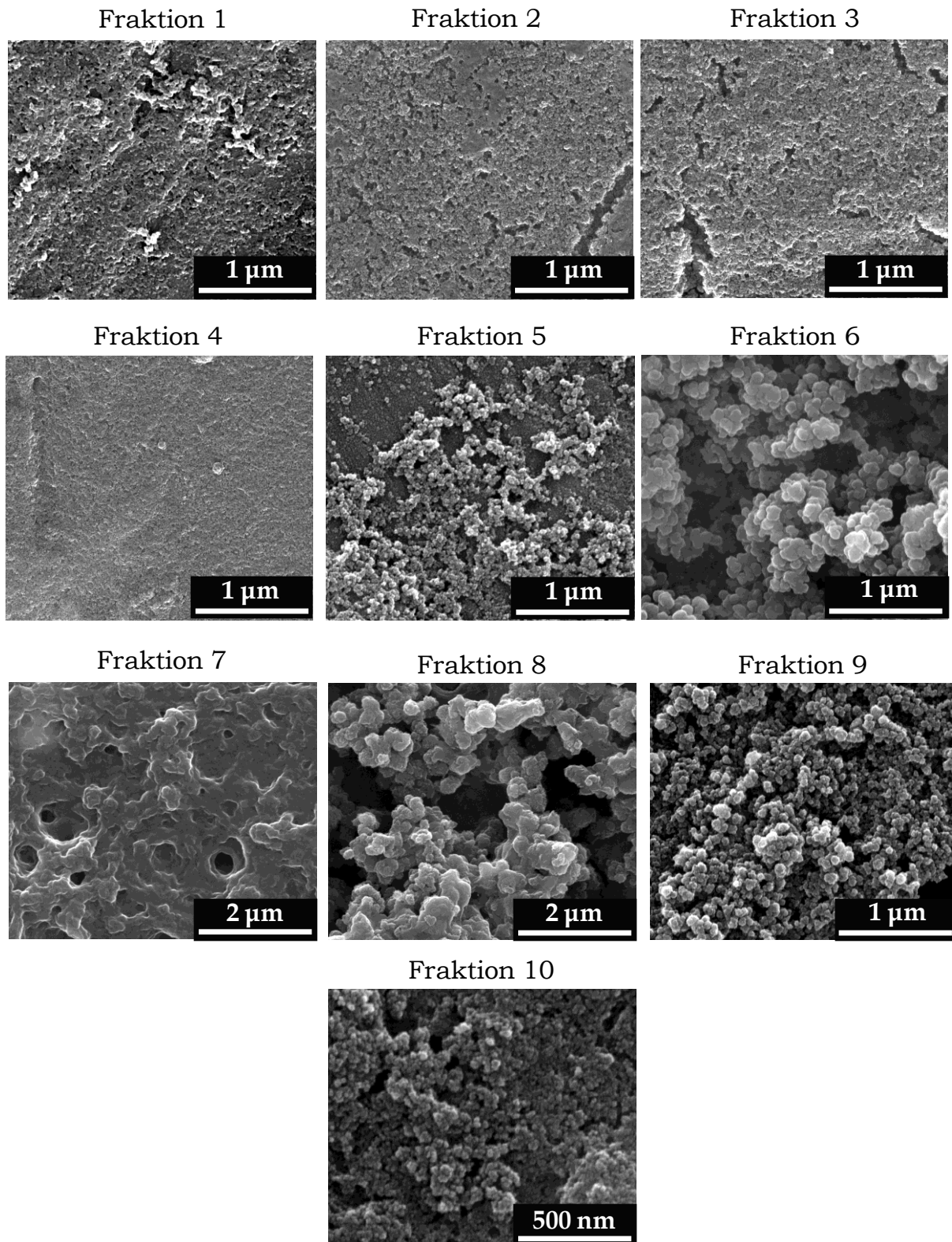


Abb. 78: REM-Aufnahmen der Fraktionen von IgA-FITC-konjugierten Calciumphosphat-Nanopartikeln nach der Gelfiltration.

Für die Detektion des gekoppelten IgA-FITC-Antikörpers wurde UV-Vis-Spektroskopie verwendet. Es konnten keine UV-Vis-Spektren von Fraktionen

aufgenommen werden, da die UV-Bande des FITC-markierten IgA-Antikörpers zu schwach war. Daher wurden die Fraktionen mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht. In den ersten vier Fraktionen war keine Fluoreszenz der IgA-konjugierten Nanopartikel zu sehen. Ab Fraktion 6 begannen die gesammelten Eluate zu fluoreszieren. Gemäß der erhaltenen REM-Aufnahmen sind Nanopartikel in Fraktion 6 zu finden. Deshalb wurde die Fraktion 6 für die folgenden zellulären Untersuchungen genutzt.

3.7.6 Zellaufnahmen von Antikörper-konjugierten Nanopartikeln

Um als Trägersystem effektiv zu sein, müssen die Antikörper-konjugierten Nanopartikel spezifisch an bestimmte Oberflächenmarker der Zellen binden. Da der für die Synthese ausgewählter IgA-Modellantikörper keine selektiven Bindungseigenschaften zu HeLa- und MG-63-Zellen besaß, wurde ein FITC-markierter Zytokeratin-Antikörper mit einer Selektivität für Epithelzellen verwendet. Analog der Synthese mit IgA-Antikörper wurden thiofunktionalisierte Calciumphosphat-Nanopartikel mit dem FITC-markierten Zytokeratin-Antikörper konjugiert und mit der Sephadex-Säule aufgereinigt. Die Bindungsspezifität der Zytokeratin-konjugierten Nanopartikel auf HeLa-Zellen sollte untersucht werden. Zur Kontrolle wurden die zellulären Aufnahmen der IgA- und Zytokeratin-konjugierten Nanopartikel jeweils an HeLa- und MG-63-Zellen getestet. Die zelluläre Internalisierung und die Verteilung der beiden Partikelarten wurden mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Die Inkubation der Zellen mit Antikörper-konjugierten Partikeln über 5 Stunden führt zu einer effizienten zellulären Aufnahme (Abb. 79). Die grün fluoreszierenden Punkte der IgA-konjugierten Calciumphosphat-Nanopartikel werden an HeLa-Zellen detektiert (Abb. 79A). Im Fall der Zytokeratin-gekoppelten Nanopartikel ist ebenfalls eine gute zelluläre Aufnahme mit beiden Zelllinien zu beobachten. Jedoch sollte betont werden, dass die Zytokeratin-konjugierten Partikel überwiegend um den Zellkern der HeLa-Zellen lokalisiert sind (Abb. 79B), während die fluoreszenzmikroskopischen

Aufnahmen der MG-63-Zellen eine ungeordnete Verteilung der grün fluoreszierenden Punkte aufweisen (Abb. 79C).

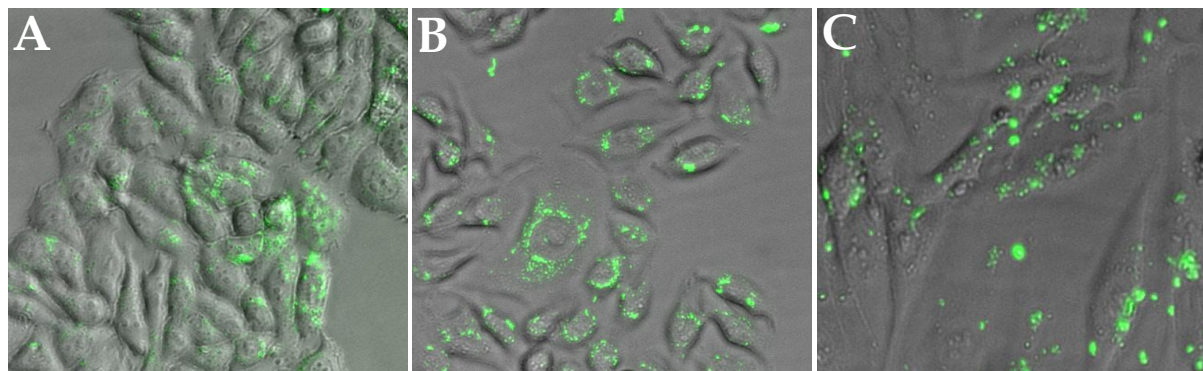


Abb. 79: Überlagerung der fluoreszenz- und lichtmikroskopischen Aufnahmen von HeLa-Zellen (A und B) und MG-63-Zellen (C) nach 5 Stunden Inkubation mit IgA-FITC-konjugierten (A) und Zytokeratin-FITC-konjugierten (B und C) Calciumphosphat-Nanopartikeln.

Zusätzlich muss beachtet werden, dass zwischen den auf der Oberfläche anhaftenden und den tatsächlich internalisierten Partikeln nicht unterschieden werden konnte. Die durch elektrostatische Wechselwirkungen stark anhaftenden Partikel werden auch durch Waschprozesse von der Zelloberfläche nicht vollständig entfernt.

Diese Zellexperimente wurden von Frau M.Sc. S. Chernousova, Anorganische Chemie, Universität Duisburg-Essen, durchgeführt.

3.7.7 Transfektion von Antikörper-konjugierten und DNA-beladenen Nanopartikeln

Eine weitere Erkenntnis der Untersuchungen ist die Herstellung der bifunktionellen Calciumphosphat-Nanopartikel und deren Verwendung als Biomolekül-Trägersystem für eine zielgerichtete Zellbindung. Die durchgeführten Untersuchungen zeigen, dass die thioolfunktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikel erfolgreich mit Plasmid-DNA beladen werden konnten (Kap. 3.5.2). In diesem Zusammenhang kommt die Frage auf, ob die Antikörper-konjugierten Nanopartikel auch simultan mit Biomolekülen bela-

den werden können. Die Beladung der thiolfunktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikel erfolgte mit zwei DNA-Plasmiden, d.h. EGFP-DNA und mCherry-DNA, die ein grün bzw. rot fluoreszierendes Protein kodieren. Der FITC-markierte IgA-Antikörper wurde als Modellantikörper für die Konjugation der Nanopartikel nach der Beladung mit EGFP-DNA oder mCherry-DNA verwendet. Die erhaltenen Nanopartikel besitzen einen Durchmesser zwischen 60 und 160 nm. Die kugelförmige Morphologie der hergestellten Nanopartikel wird mittels REM gezeigt (Abb. 80).

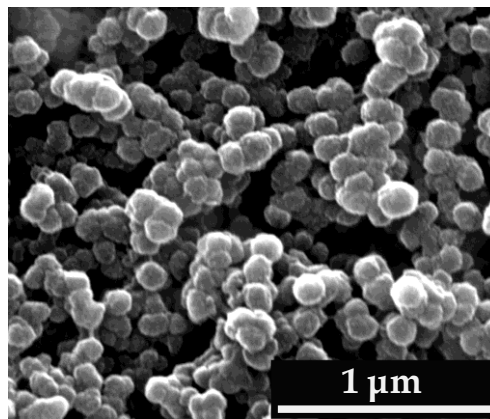


Abb. 80: REM-Aufnahme der DNA-beladenen und IgA-FITC-konjugierten Calciumphosphat-Nanopartikel.

Die durchlicht- und fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der HeLa-Zellen nach der Transfektion mit mCherry-DNA-beladenen und IgA-FITC-konjugierten Calciumphosphat-Nanopartikeln sind in Abbildung 81 gezeigt. Nach der Transfektion werden sowohl eine intrazelluläre Expression von dem rot fluoreszierenden Protein als auch ein bedeutender Anteil an grün fluoreszierenden Punkten von FITC-markierten IgA-Antikörper festgestellt. Die in den Zellen zu erkennenden grünen Fluoreszenzsignale deuten auf eine intrazelluläre Lokalisation der Partikel hin. Durch eine Überlagerung der rot fluoreszierenden Zellen und der grün fluoreszierenden Partikel sind gelb fluoreszierende Punkte erkennbar.

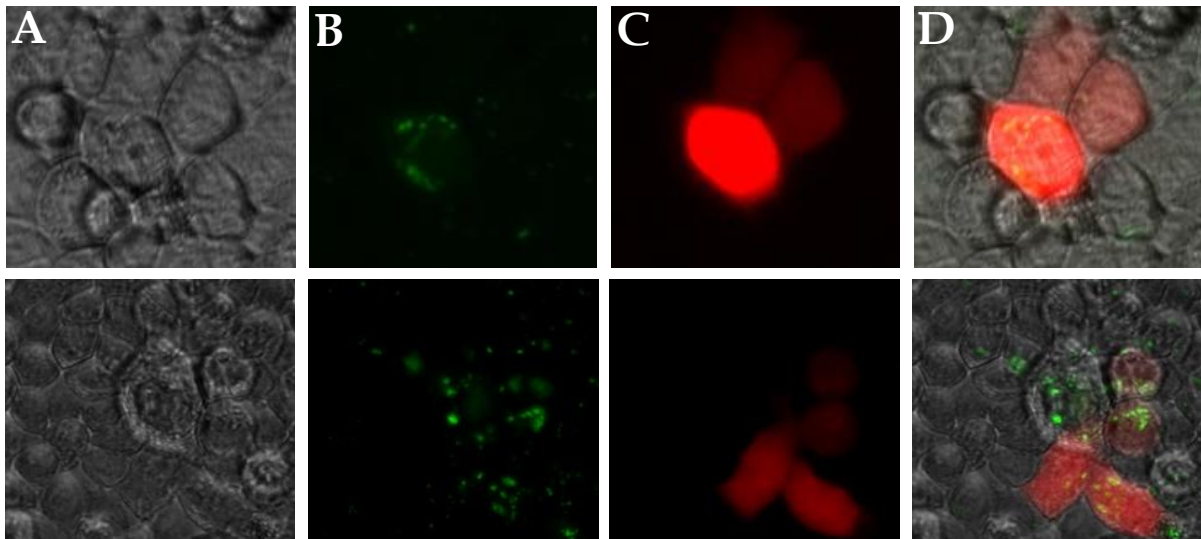


Abb. 81: Mikroskopische Aufnahmen von HeLa-Zellen nach der Transfektion mit mCherry-DNA-beladenen und IgA-FITC-konjugierten Calciumphosphat-Nanopartikeln. *A:* Lichtfeld; *B:* Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von FITC-markiertem IgA-Antikörper; *C:* Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von rot fluoreszierenden HeLa-Zellen nach der Transfektion mit mCherry-DNA; *D:* Überlagerung der A-C Aufnahmen.

Um einen weiteren Hinweis auf die Transfektion zu erhalten, wurden HeLa-Zellen mit EGFP-DNA-beladenen und IgA-FITC-konjugierten Calciumphosphat-Nanopartikeln transfiziert und mittels Fluoreszenzmikroskop analysiert. Die Transfektionsergebnisse der HeLa-Zellen sind in Abbildung 82 gezeigt. Die Lokalisation der grün fluoreszierenden Punkte in transfizierenden Zellen (Expression von dem grün fluoreszierenden Protein nach der Transfektion mit EGFP-DNA) ist trotz gleicher Farbe gut in den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen zu erkennen.

Diese Ergebnisse stimmen mit den Transfektionsergebnissen der mCherry-DNA-beladenen Nanopartikel überein. Dadurch konnte gezeigt werden, dass die thiofunktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikel gleichzeitig mit dem DNA-Plasmid beladen und mit dem Antikörper konjugiert werden können.

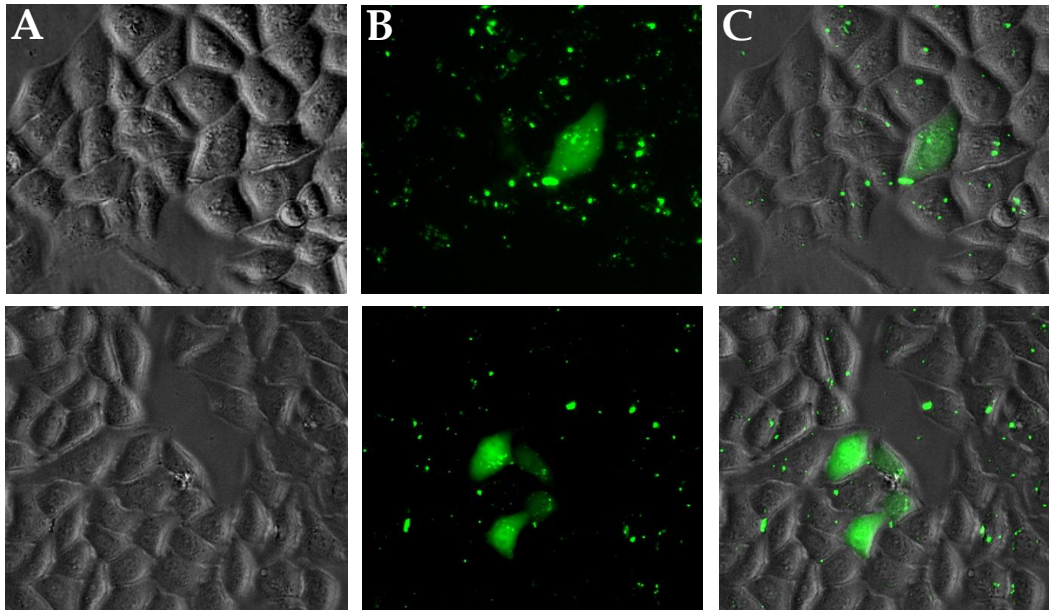


Abb. 82: Mikroskopische Aufnahmen der HeLa-Zellen nach der Transfektion mit EGFP-DNA-beladenen und IgA-FITC-konjugierten Calciumphosphat-Nanopartikeln. **A:** Lichtfeld; **B:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von FITC-markiertem IgA-Antikörper und von grün fluoreszierenden HeLa-Zellen nach der Transfektion mit EGFP-DNA; **C:** Überlagerung der A-B Aufnahmen.

Diese Zelleexperimente wurden von Frau M.Sc. S. Chernousova, Anorganische Chemie, Universität Duisburg-Essen, durchgeführt.

3.7.8 Antikörper-konjugierte Nanopartikel zur selektiven Adressierung *in vitro*

Da die im Kapitel 3.5.6 durchgeführten *in vitro*-Untersuchungen zur spezifischen Adressierung der Antikörper-konjugierten Nanopartikel keine eindeutigen Ergebnisse geliefert haben, wurden die Calciumphosphat-Nanopartikel mit einem FITC-markierten α CD11c-Antikörper konjugiert und Milzzellen einer naïven BALB/c Maus damit für 4 Stunden inkubiert. Der α CD11c-Antikörper bindet spezifisch an die dendritischen Zellen, deren Population nach der Inkubation mit α CD11c-Antikörper-konjugierten Nanopartikeln in Milzzellen analysiert wurde. Anschließend wurden die Zellen mit einem Allophycocyanin (APC)-markierten α CD11c-Antikörper gefärbt. Ein prozentualer Anteil der für die beiden Fluorophore (FITC und APC) positiven dendritischen Zellen in der Population wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Um die Effektivität der Bindung eines spezifischen Antikörpers an die Calciumphosphat-Nanopartikel beurteilen zu können, wurden die Milzzellen mit Calciumphosphat-Nanopartikeln inkubiert, die mit dem entsprechenden IgG-Kontrollantikörper konjugiert waren.

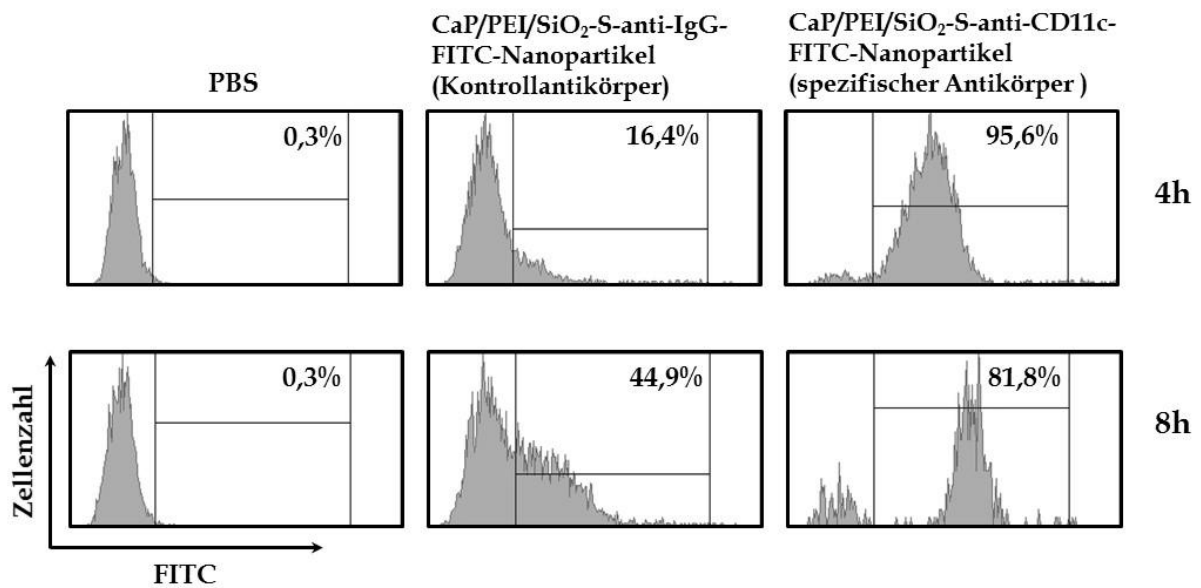


Abb. 83: *In vitro* FACS-Ergebnisse der dendritischen Zellen nach 4 Stunden Inkubation mit anti-IgG-FITC- (Kontrollantikörper) und anti-CD11c-FITC- (spezifischer Antikörper) konjugierten Calciumphosphat-Nanopartikeln.

Abbildung 83 zeigt, dass durch die kovalente Konjugation der thiofunktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikel mit dem anti-CD11c-Antikörper bereits nach 4 Stunden eine Assoziation von ca. 96 % der in der Milzzellkultur enthaltenen dendritischen Zellen mit Calciumphosphat-Nanopartikeln detektiert werden kann.

Nach der Inkubation der Milzzellen mit Calciumphosphat-Nanopartikeln, die mit dem IgG-Kontrollantikörper konjugiert waren, ist diese Assoziation um ein Vielfaches geringer und beträgt nur 16,4 % der Gesamtzahl von dendritischen Zellen in der analysierten Zellpopulation. Die längere Inkubationszeit (8 Stunden) steigert die Assoziation der Kontrollnanopartikel mit den dendritischen Zellen in der Milzzellkultur (ca. 45 %), was zu einer unspezifischen Aufnahme der Nanopartikel zurückzuführen ist. Dieser *in vitro*-Versuch zeigt, dass sich die Adressierung der Calciumphosphat-Nanopartikel durch Konjugation mit einem zellspezifischen Antikörper deutlich steigern lässt.

Diese Zellexperimente wurden von Herrn Dr. T. Knuschke, Medizinische Mikrobiologie, Universitätsklinikum Essen, durchgeführt.

3.7.9 Antikörper-konjugierte Nanopartikel zur selektiven Adressierung *in vivo*

Nachdem die spezifische Adressierung der anti-CD11c-Antikörper-konjugierten Calciumphosphat-Nanopartikel an dendritischen Zellen *in vitro* gezeigt werden konnte, sollte geklärt werden, ob dieser Effekt der zellspezifischen Adressierung auch *in vivo* möglich ist. Dafür wurden Antikörper-konjugierte Partikel *in vivo* getestet. Vier Stunden nach der Injektion von Antikörper-konjugierten Partikeln wurden die Milze entnommen und der Anteil der positiven dendritischen Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. Etwa 46 % der dendritischen Zellen in der Milz sind mit anti-CD11c-konjugierten Calciumphosphat-Nanopartikeln assoziiert (Abb. 84).

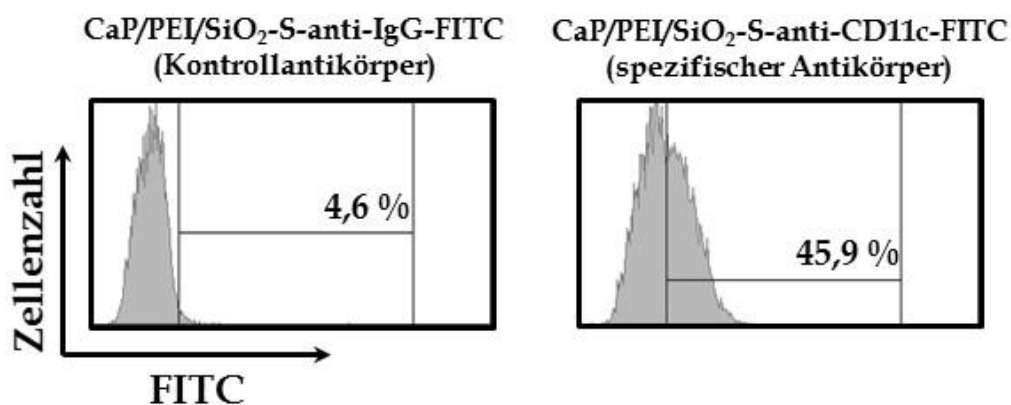


Abb. 84: *In vivo* FACS-Ergebnisse der dendritischen Zellen, die 4 Stunden nach der Injektion in der Milz bestimmt wurden. Zur selektiven Adressierung von dendritischen Zellen wurden anti-CD11c-FITC-konjugierten Calciumphosphat-Nanopartikeln untersucht. Als Kontrolle wurden anti-IgG-FITC-konjugierten Calciumphosphat-Nanopartikel getestet.

Eine vergleichbar hohe Assoziation ist nach der Injektion der anti-IgG-konjugierten Calciumphosphat-Nanopartikel nicht zu detektieren (etwa 5 %). Somit kann die zellgerichtete Adressierung der Antikörper-konjugierten Calciumphosphat-Nanopartikel auch *in vivo* gezeigt werden.

Diese Zellexperimente wurden von Herrn Dr. T. Knuschke, Medizinische Mikrobiologie, Universitätsklinikum Essen, durchgeführt.

3.8 Konjugation von Nanopartikeln mit HEL zur selektiven Adressierung von B-Zellen

B-Zellen sind wichtige Träger der humoralen Immunantwort. Die Entwicklung einer B-Zelle von der pluripotenten Stammzelle bis hin zur unreifen B-Zelle findet im Knochenmark statt. Bei der Entwicklung der B-Zelle ist die Bildung eines funktionierenden B-Zellrezeptors (*B-cell receptor*, BCR) von großer Bedeutung. B-Zellrezeptor ist eine membrangebundene Form des Antikörpers und dient auf der B-Zelloberfläche als Antigenrezeptor. Die B-Zellen können auf ihrer Oberfläche ein sehr breites Repertoire an Antigenrezeptoren ausbilden, wobei eine einzelne Zelle immer nur Rezeptoren derselben Spezifität trägt.

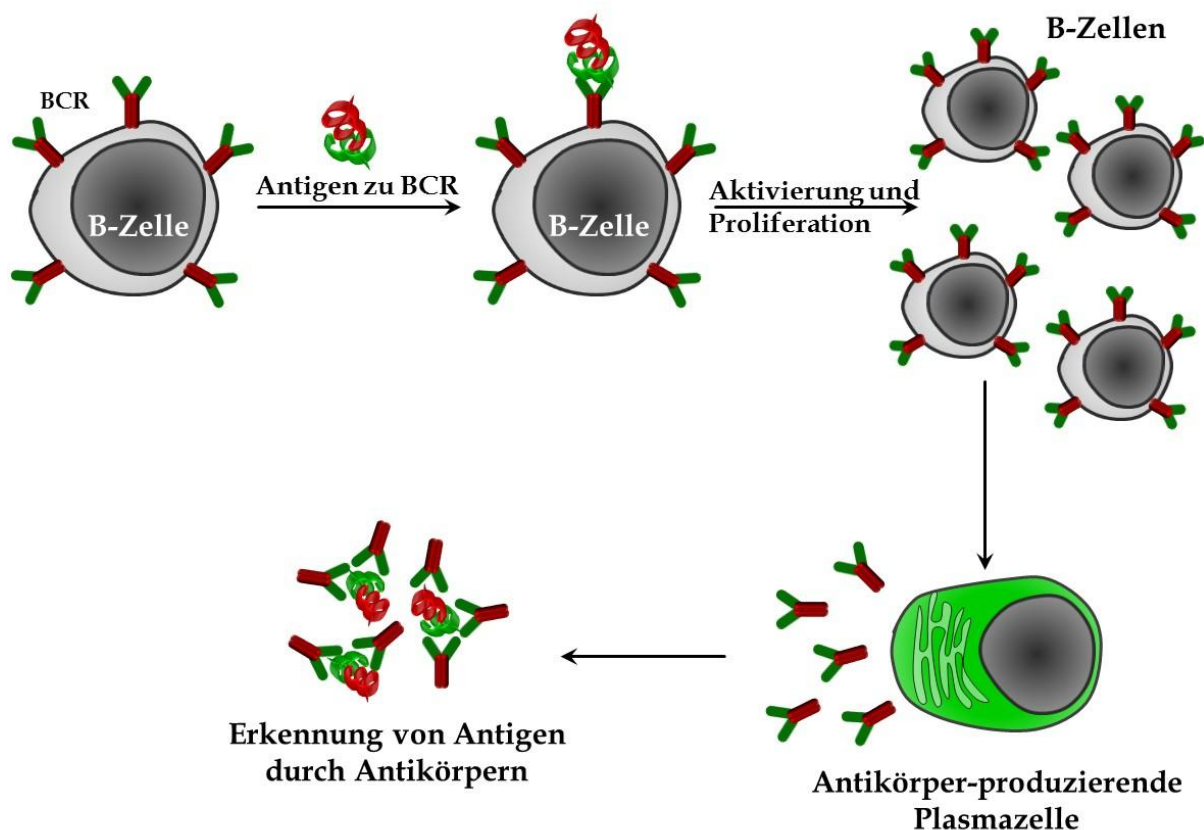


Abb. 85: Auslösung der adaptiven Immunantwort durch die Bindung der Antigene an die B-Zellrezeptoren (BCR) auf der B-Zelloberfläche.

Durch eine Bindung der spezifischen Antigene (Proteine) an die Antigenrezeptoren auf der Oberfläche von B-Zellen wird die B-Zelle aktiviert und

beginnt sich zu teilen. Ein Teil der B-Zellen wird zu Antikörper-produzierenden Plasmazellen (Abb. 85). Wie bereits aus den Literaturdaten bekannt ist, sind oligomere Antigene im Vergleich zu ihren monovalenten Formen bessere Aktivatoren der B-Zell-Antwort.^{206, 207} Somit werden verschiedene biologische Nanostrukturen wie Exosomen, virusähnliche Partikel (*virus-like particles*, VLP) sowie abgeschwächte Viren verwendet, um eine verbesserte Antikörperantwort zu induzieren.²⁰⁸ Allerdings können diese nanopartikulären Trägersysteme aufgrund ihres biologischen Ursprungs unerwünschte Reste von anderen Biomolekülen enthalten.²⁰⁹ Eine andere Alternative stellen anorganische Nanopartikel von immunologisch inerten Materialien dar, die bereits in der Biologie und Medizin verwendet werden.^{14, 45, 210-213} Gemäß der Anwendungsbedürfnisse können die Partikel mit Biomolekülen wie Plasmiden für die Transfektion,⁴³ siRNA für die Genstummschaltung⁴⁴ oder mit photosensitiven Farbstoffen für die Photodynamische Therapie^{48, 112} funktionalisiert werden. Die Antigen-beladenen Partikel werden als potentielle Impfstoffkandidaten intensiv untersucht.²¹⁴ Unter anderem zeigen die Antigen-beladenen, bioabbaubaren Calciumphosphat-Nanopartikel eine effiziente Aktivierung der dendritischen Zellen und der spezifischen CD4- und CD8-T-Zell-Antworten *in vitro* und *in vivo*.^{8, 14, 45} Jedoch gibt es keine Information über die direkte Wechselwirkung der Protein-funktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikel mit Antigen-spezifischen B-Zellen. Da B-Zellen ein breites Repertoire an B-Zell-Rezeptoren tragen, ist die Häufigkeit der Erkennung von einem bestimmten Antigen sehr gering.^{215, 216} Es macht die Analysen von Antigen-spezifischen B-Zellen in Menschen und Wildtyp-Tiermodellen ziemlich kompliziert. Hierzu wurden die BCR-transgenen B-Zellen aus SW-HEL-Mäusen (SW: Swiss Webster Maus; HEL+B-Zellen) als Modell zu einer B-Zellantwort ausgewählt,²¹⁷ um die direkten Auswirkungen der HEL-konjugierten (*hen egg lysozyme*, HEL) Calciumphosphat-Nanopartikel auf die Antigen-spezifischen B-Zellen zu untersuchen. Wildtyp C57BL/6-Mäuse (BL6) wurden als Kontrolle für die BCR-unspezifische Wirkung der HEL-konjugierten Partikel auf B-Zellen getestet.

3.8.1 Charakterisierung der HEL- und BSA-konjugierten Nanopartikel

Die Konjugation der thiofunktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikel mit HEL-Alexa488 oder BSA-FITC erfolgte entsprechend der in Kapitel 3.7.5 dargestellten Synthese. PEI wurde als Stabilisator für die Synthese der positiv geladenen Partikel verwendet. Nachfolgend wurden die PEI-stabilisierten Nanopartikel mit einer Silica-Schale modifiziert und schließlich mit den Thiolgruppen funktionalisiert. Die Konjugation der thiofunktionalisierten Nanopartikel mit einem Protein erfolgte über den Crosslinker Sulfo-SMCC (Abb. 77). Der Aufbau der Protein-konjugierten Calciumphosphat-Nanopartikel ist in Abbildung 86 gezeigt.

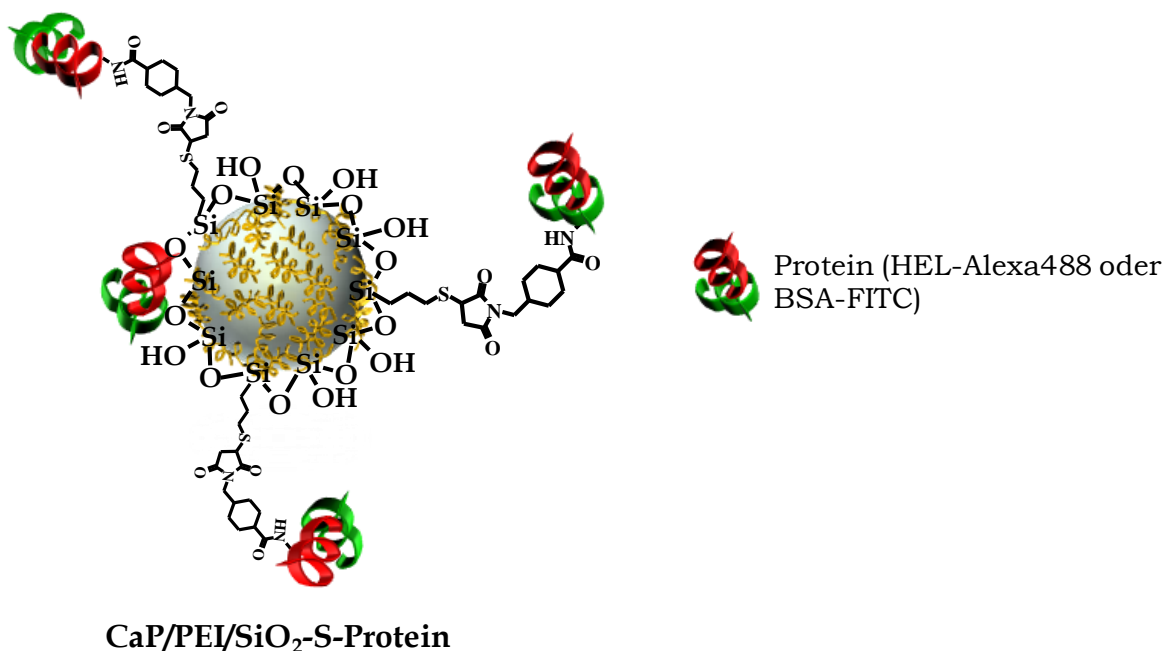


Abb. 86: Schematische Darstellung der HEL-Alexa488- oder BSA-FITC-konjugierten Calciumphosphat-Nanopartikel.

Die Morphologie und Partikelgrößenverteilung der Protein-konjugierten Calciumphosphat-Nanopartikel wurden mittels DLS und REM bestimmt. In Abbildung 87 sind die Verteilungskurven der DLS-Messungen von HEL-Alexa488- und BSA-FITC-konjugierten Nanopartikeln gezeigt. Die breite Verteilung der beiden Partikelarten zeigt, dass sich ein Teil der Nanopartikel nach der Konjugation mit Proteinen nicht vollständig redispergieren lässt.

Die hydrodynamischen Durchmesser der synthetisierten Nanopartikel liegen zwischen 247 nm und 410 nm, jeweils nach der Konjugation mit HEL-Alexa488 oder BSA-FITC.

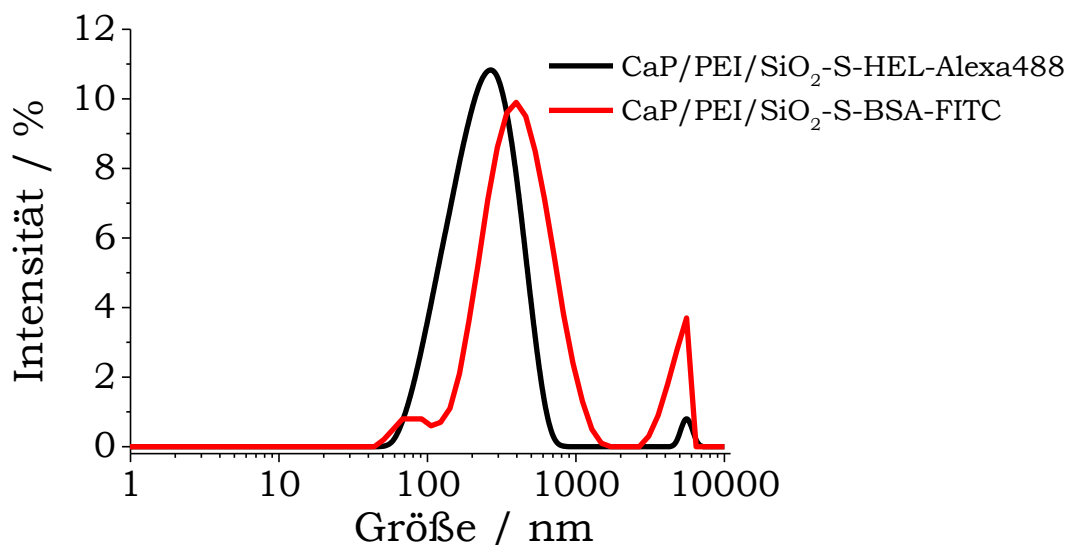


Abb. 87: Partikelgrößenverteilung (DLS) der Protein-konjugierten Calciumphosphat-Nanopartikel.

Die Polydispersitätsindizes von 0,4 deuten auf einen gewissen Agglomerationsgrad der Protein-konjugierten Nanopartikel hin. Das Zetapotential zeigt, dass beide Partikelarten eine positive Ladung von +20 mV auf der Oberfläche haben (Tabelle 9).

Tabelle 9: Kolloidchemische Parameter der HEL-Alexa488- bzw. BSA-FITC-konjugierten Silica-modifizierten Calciumphosphat-Nanopartikel.

Probe	Durchmesser in nm (DLS)	PDI	Zetapotential in mV
CaP/PEI/SiO ₂ -S-HEL-Alexa488	247	0,41	21±4
CaP/PEI/SiO ₂ -S-BSA-FITC	410	0,42	20±4

Die in Abbildung 88 dargestellten REM-Aufnahmen zeigen Calciumphosphat-Nanopartikel, die mit HEL-Alexa488 oder BSA-FITC konjugiert wurden. Anhand dieser Aufnahmen ist ersichtlich, dass es sich um Partikel mit einer sphärischen Morphologie handelt. Diese Nanopartikel

weisen eine einheitliche Größenverteilung mit einem Durchmesser von 40-100 nm bzw. 100-170 nm für BSA-FITC- und HEL-Alexa488-konjugierten Partikel auf.

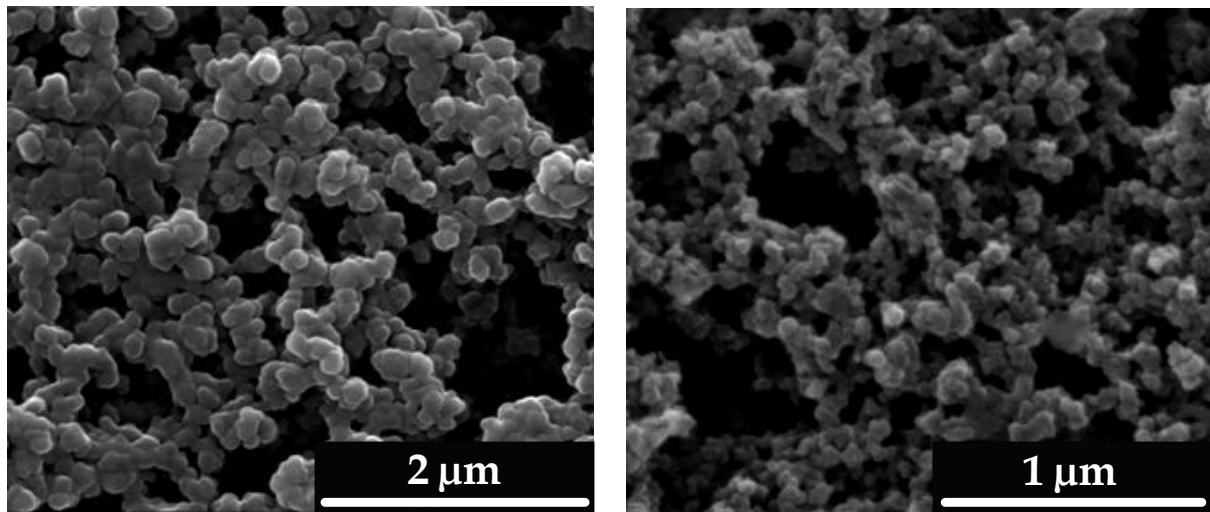


Abb. 88: REM-Aufnahmen der HEL-Alexa488- (*links*) oder BSA-FITC-konjugierten (*rechts*) Calciumphosphat-Nanopartikel.

Zur Beurteilung des Konjugationsverfahrens wurde die Menge des gekoppelten Proteins spektroskopisch bestimmt. Ausgehend von einer Stammlösung der Konzentration $0,75 \text{ mg mL}^{-1}$ für HEL-Alexa488 und $0,9 \text{ mg mL}^{-1}$ für BSA-FITC wurden die entsprechenden Verdünnungen angesetzt (Abb. 89). Mit Hilfe des Lambert-Beer'schen-Gesetzes können aus der linearen Anpassung die Konzentrationen von HEL-Alexa488 oder BSA-FITC im Überstand bestimmt werden.

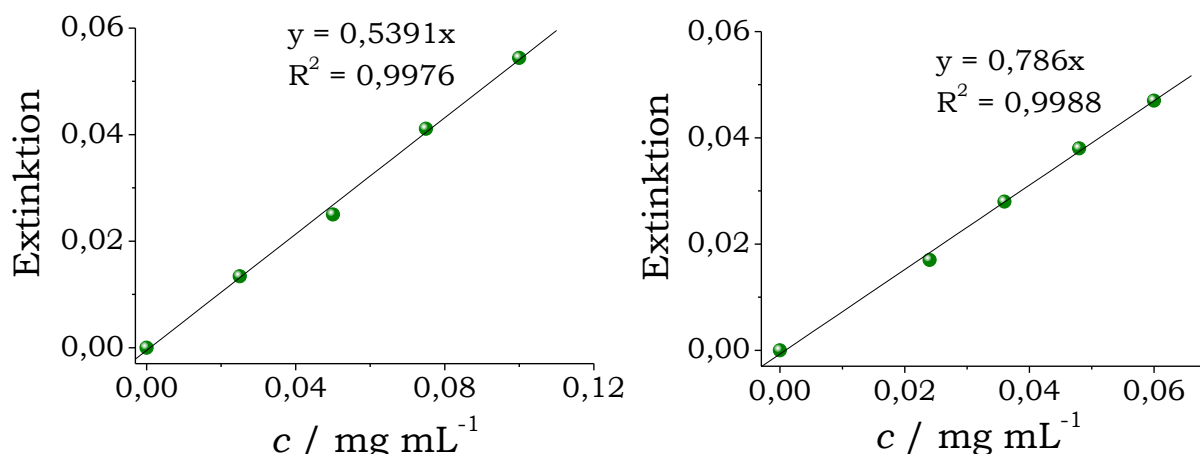


Abb. 89: Kalibrationsgerade von HEL-Alexa488 (*links*) und BSA-FITC (*rechts*) für die Konzentrationsbestimmung nach der Konjugation mit Calciumphosphat-Nanopartikeln. Die Extinktion wurde bei der Wellenlänge von $\lambda = 490$ nm für HEL-Alexa488 und von $\lambda = 495$ nm für BSA-FITC als Funktion der Konzentration aufgetragen (pH = 7,5).

In Tabelle 10 sind die Konzentrationen der nicht gekoppelten Proteine im Überstand sowie die daraus berechnete gebundene Menge von HEL-Alexa488 und BSA-FITC an den Calciumphosphat-Nanopartikeln aufgeführt.

Tabelle 10: Zusammenfassung der Konzentrationen an BSA-FITC und HEL-Alexa488 in den Kolloiden.

Konjugierte Nanopartikel	Eingesetzte Menge an Protein / $\mu\text{g mL}^{-1}$ Kolloid	Konzentration im Überstand / $\mu\text{g mL}^{-1}$	Konzentration an gekoppeltem Protein / $\mu\text{g mL}^{-1}$ Kolloid
CaP/PEI/SiO ₂ -S-HEL-Alexa488	99,7	66,2	33,5
CaP/PEI/SiO ₂ -S-BSA-FITC	59,8	7,0	52,8

Die Calciumphosphat-Menge in den hergestellten Protein-konjugierten Nanopartikeln wird über den Ca-Gehalt in den Nanopartikeln berechnet. Für die Berechnungen wird angenommen, dass stöchiometrischer Hydroxylapatit (Ca/P = 1,67) entsteht. Die mittels AAS ermittelte Konzentration von Ca^{2+} beträgt $19 \mu\text{g mL}^{-1}$ und $26 \mu\text{g mL}^{-1}$ jeweils für die HEL- und BSA-konjugier-

ten Nanopartikel, entsprechend $48 \mu\text{g mL}^{-1}$ und $66 \mu\text{g mL}^{-1}$ Calciumphosphat in der Dispersion. Die Berechnungen der Partikelkonzentration unter Annahme eines mittleren Radius von $r(\text{NP}) = 35 \cdot 10^{-9} \text{ m}$ ergeben, dass nach der Synthese 1 mL Dispersion $8,6 \cdot 10^{10}$ bzw. $1,2 \cdot 10^{11}$ Calciumphosphat-Nanopartikel enthält und jedes Partikel mit ca. 16400 HEL-Alexa488 oder mit ca. 4000 BSA-FITC Protein-Molekülen gebunden ist. Die in den Zellexperimenten verwendeten Mengen der BSA-FITC- sowie HEL-Alexa488-konjugierten Calciumphosphat-Nanopartikel sind in Tabelle 11 zusammengefasst.

Tabelle 11: Effektive Konzentration der Calciumphosphat-Nanopartikel und der Proteine in Zellkulturexperimenten.

Probe	Menge / μL	Konzentration der CaP-NP / Anzahl mL^{-1}	Konzentration des Proteins / $\mu\text{g mL}^{-1}$
CaP/PEI/SiO₂-S-HEL-Alexa488			
CaP-HEL 0.01	0,01	$4,3 \cdot 10^6$	$1,7 \cdot 10^{-3}$
CaP-HEL 0.1	0,1	$4,3 \cdot 10^7$	$1,7 \cdot 10^{-2}$
CaP-HEL 1	1	$4,3 \cdot 10^8$	$1,7 \cdot 10^{-1}$
CaP-HEL 10	10	$4,3 \cdot 10^9$	$1,7 \cdot 10^0$
CaP/PEI/SiO₂-S-BSA-FITC			
CaP-BSA 0.01	0,01	$5,9 \cdot 10^6$	$2,6 \cdot 10^{-3}$
CaP-BSA 0.1	0,1	$5,9 \cdot 10^7$	$2,6 \cdot 10^{-2}$
CaP-BSA 1	1	$5,9 \cdot 10^8$	$2,6 \cdot 10^{-1}$
CaP-BSA 10	10	$5,9 \cdot 10^9$	$2,6 \cdot 10^0$

Die FACS-Messungen der Protein-konjugierten Calciumphosphat-Nanopartikel in Zellexperimenten wurden über Fluoreszenz-markierte Proteine durchgeführt.

3.8.2 BCR-abhängiges Targeting der Protein-konjugierten Nanopartikel

Es wurde erst ein direktes Targeting der HEL-konjugierten Calciumphosphat-Nanopartikel an die Antigen-spezifischen B-Zellen im Vergleich zur BCR-unabhängigen Bindung durchgeführt. Für diese Untersuchungsreihe wurden Wildtyp (WT) BL6-Mäuse mit einem breiten BCR-Repertoire und SW-HEL-Mäuse mit einem RAG⁺-Hintergrund ausgewählt. Aufgrund WT-RAG (Rekombination-aktivierendes-Gen, RAG) tragen nur bis zu 40 % aller B-Zellen aus SW-HEL-Mäusen die HEL-positiven B-Zellrezeptoren (HEL⁺-BCR). Der Rest der B-Zellen hat einen V_H-Genersatz und bindet kein HEL an ihrem BCR.²¹⁷ Zur Minimierung der aktiven Rezeptor-vermittelten Endozytose²¹⁸ und Makropinozytose wurden die Zellen für eine Stunde auf Eis gekühlt. Vorgekühlte Milzzellen der beiden Mausmodelle wurden mit verschiedenen Mengen der HEL-konjugierten Calciumphosphat-Nanopartikel für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen zusätzlich mit dem Alexa647-markierten löslichen HEL (sHEL) angefärbt, um die freien HEL⁺-BCR auf der Zelloberfläche zu analysieren (Abb. 90A). Die Dot Plot-Darstellungen der linken Spalte (Kontrolle) zeigen, dass die B-Zellen von BL6-Mäusen praktisch kein HEL-Alexa647 binden. Dagegen haben 39 % der B-Zellen von SW-HEL-Mäusen HEL⁺-BCR auf ihrer Oberfläche. Mit den zwei ausgewählten Konzentrationen von HEL-konjugierten Calciumphosphat-Nanopartikeln konnte die BCR-spezifische Bindung an die Oberfläche der SW-HEL B-Zellen und BCR-unspezifische Bindung an B-Zellen von BL6-Mäusen gezeigt werden. Für die Konzentration von $4,3 \cdot 10^8$ der HEL-konjugierten Partikeln (CaP-HEL 1) pro 200 μ L Zellsuspension gibt es nahezu keine unspezifische Bindung an BL6 B-Zellen und eine teilweise Besetzung der HEL⁺-BCR an SW-HEL B-Zellen (Abb. 90A, CaP-HEL 1). Eine zehnfach höhere Menge der HEL-konjugierten Nanopartikel führt zu einer vollständigen Besetzung der HEL⁺-BCR an SW-HEL B-Zellen (Abb. 90A, CaP-HEL 10). Um die Antigenspezifität der transgenen SW-HEL B-Zellen zu beweisen, wurden unspezifische Kontrollnanopartikel hergestellt. Hierzu wurden die

BSA-FITC-konjugierten Calciumphosphat-Nanopartikel verwendet. Die in Abbildung 90B dargestellten FACS-Ergebnisse zeigen, dass es bei der Verwendung der höheren Konzentration der Kontrollpartikel (CaP-BSA 10) keine konkurrierende Bindung an HEL⁺-BCR zwischen HEL-Alexa647 und BSA-FITC-konjugierten Partikeln gibt. Die Bindung der Kontrollnanopartikel wird zwischen HEL⁺ und HEL⁻ in Milzzellen von SW-HEL RAG⁺ Mäusen verteilt. Daher können HEL-konjugierte Calciumphosphat-Nanopartikel in geringerer Konzentration die BCR-spezifischen B-Zellen in der Milzzellsuspension gezielt binden. In höheren Konzentrationen binden die Calciumphosphat-Nanopartikel an die B-Zellen unabhängig von der BCR-Spezifität.

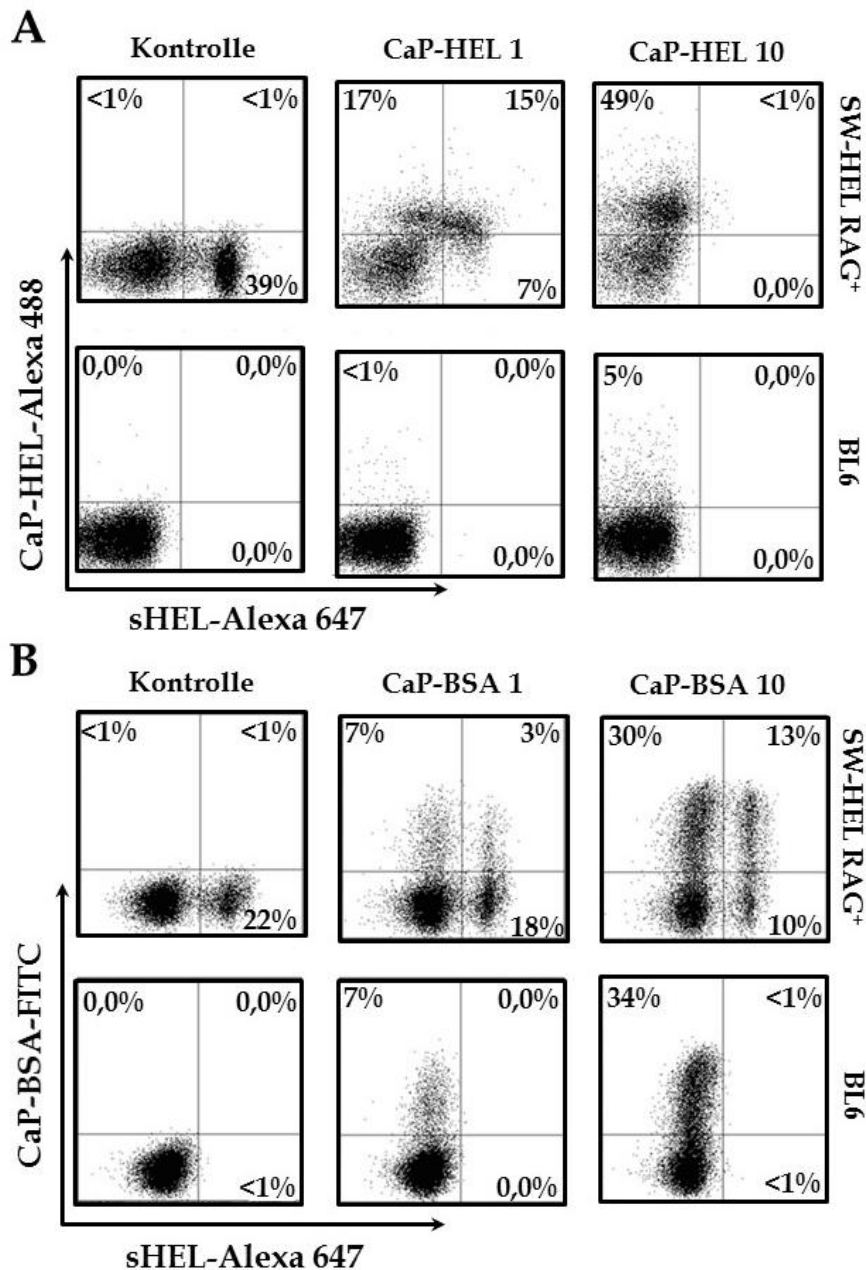


Abb. 90: Bindung der Protein-konjugierten Nanopartikel an die Antigen-spezifischen und nicht spezifischen B-Zellen. Die Milzzellen von SW-HEL RAG⁺ (*obere Reihe*) und von BL6- (*untere Reihe*) Mäusen wurden mit verschiedenen Mengen (1 μ L oder 10 μ L der Protein-konjugierten Partikel pro 200 μ L der Zellsuspension) der HEL-Alexa488- (A) und BSA-FITC- (B) konjugierten Calciumphosphat-Nanopartikel für 30 min auf Eis inkubiert, um die Antigen-spezifische und nicht spezifische Bindung der Partikel zu analysieren. Nach der Inkubation wurden die Zellen gewaschen und mit löslichem HEL-Alexa647 angefärbt.

3.8.3 Aufnahme der HEL-konjugierten Nanopartikel mit B-Zellen

Des Weiteren wurde die Aufnahme der verschiedenen Mengen von HEL-konjugierten Nanopartikeln von BCR-spezifischen und unspezifischen Zellen untersucht. Hierfür wurden die frisch isolierten naiven B-Zellen von BL6 und SW-HEL RAG⁻ Mäusen (alle B-Zellen sind HEL positiv, HEL⁺-BCR) verwendet. Es konnte eine stark Dosis-abhängige Zunahme der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) der SW-HEL B-Zellen festgestellt werden. Die Kontrollzellen (BL6 B-Zellen) zeigen einen Unterschied nur bei den höheren eingesetzten Konzentrationen (Abb. 91A). Um einen Unterschied zwischen einer Oberflächenbindung und der Aufnahme festzustellen, wurden die Zellen trypsiniert. Dadurch ist es möglich, nicht internalisiertes HEL-Alexa488 Protein von der Zelloberfläche zu entfernen. Die Effizienz der Trypsinierung und Dissoziation des Fluoreszenz-markierten Antikörpers gegen den B-Zell-Marker B220 von der B-Zelloberfläche sind in Abbildung 91B dargestellt. Die Dosis-abhängige Internalisierung der HEL-Alexa488-konjugierten Nanopartikel durch die Antigen-spezifischen B-Zellen nach 2 Stunden Inkubation bei 37 °C ist in Abbildung 91A (erste Spalte) gezeigt. Die ersten zwei Spalten in Abbildungen 91A zeigen die gleichen Proben mit und ohne Trypsinierung. Interessanterweise entspricht die Fluoreszenzintensität der trypsinisierten Zellen der Fluoreszenzintensität der Zellen, die mit der gleichen Menge der HEL-Alexa488-konjugierten Partikel für 2 Stunden auf Eis inkubiert wurden (Abb. 91A). Es scheint, dass alle Partikel, die gezielt an die Zelloberfläche der Antigen-spezifischen B-Zellen binden, effizient internalisiert werden können. Übermäßige Mengen der HEL-konjugierten Nanopartikel beladen die BCR-unspezifischen B-Zellen bei 37 °C (Abb. 91A, rechts), aber auch in diesem Fall entspricht die Menge der internalisierten Nanopartikel der Partikelmenge, die auf der Zelloberfläche nach der Inkubation auf Eis gebunden war (Abb. 91C).

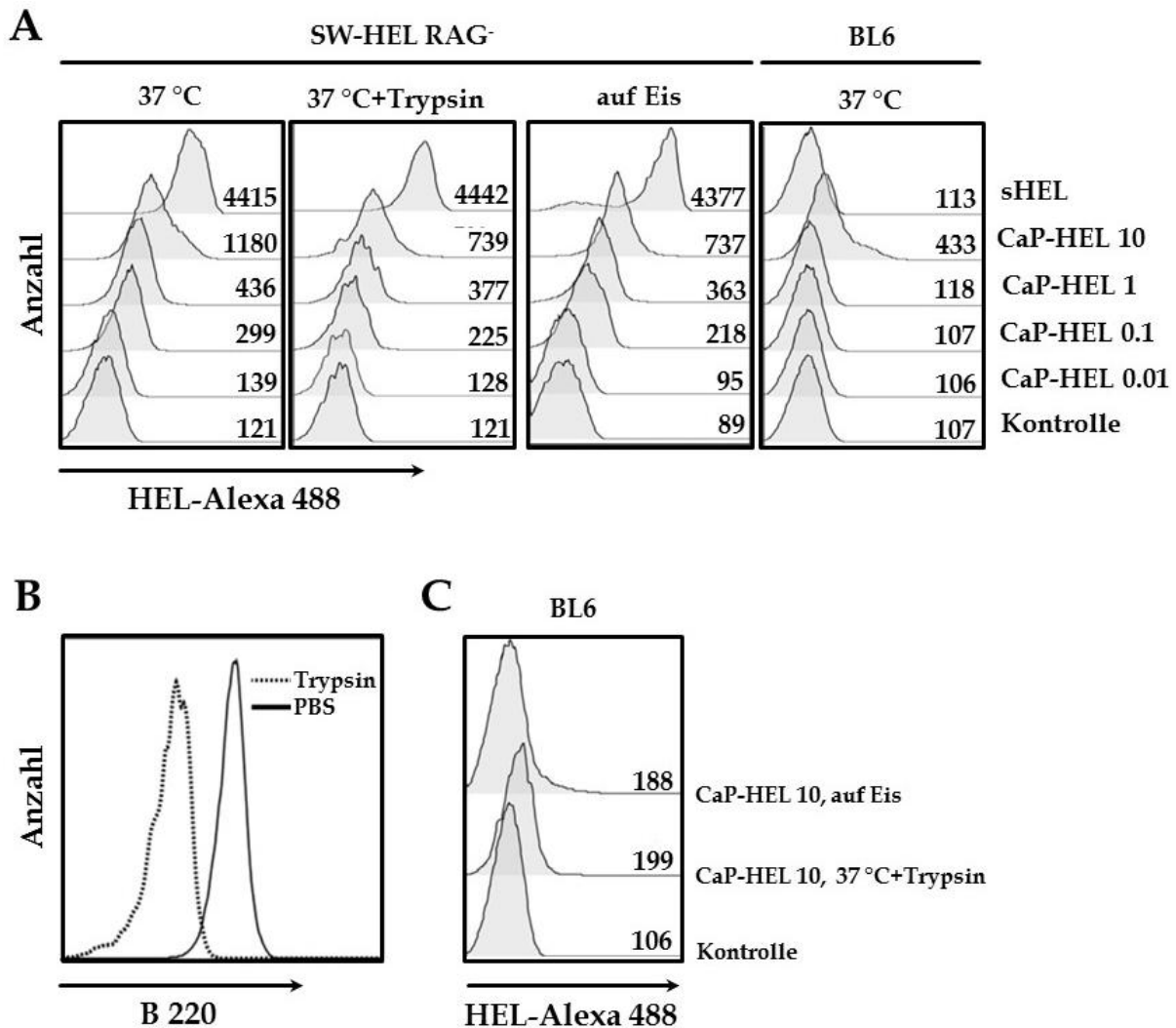


Abb. 91: Internalisierung der HEL-konjugierten Calciumphosphat-Nanopartikel durch Antigen-spezifische und nicht spezifische B-Zellen. **A:** Naive B-Zellen wurden aus SW-HEL RAG⁻ und BL6-Mäusen isoliert. Die Zellen wurden bei 37 °C in Gegenwart der verschiedenen Mengen von HEL-Alexa488-konjugierten Partikeln inkubiert (von 0,01 bis 10 µL der Partikel pro 200 µL Zellsuspension). Dosis-abhängige Internalisierung von HEL-Alexa488-konjugierten Partikeln und löslichem HEL-Alexa488 (0,1 µg pro 200 µL Zellsuspension) nach Trypsinierung gegenüber Dosis-abhängiger Bindung auf der Oberfläche auf Eis von SW-HEL RAG-Antigen-spezifischen B-Zellen. **B:** Effizienz der Entfernung der Proteine aus der Zelloberfläche mit EDTA-Trypsin. **C:** Internalisierung gegenüber der Bindung von HEL-Alexa488-konjugierten Nanopartikeln (10 µL der Partikel pro 200 µL Zellsuspension) durch BL6 B-Zellen.

3.8.4 Verlust von CD62L bei Antigen-spezifischen B-Zellen

CD62L ist ein Typ1-Transmembranglykoprotein, das eine wichtige Rolle in der Anfangsphase der Immunantwort spielt. Nach der Antigen-spezifischen Kreuzvernetzung (*crosslinking*) der B-Zellrezeptoren (BCR) findet ein schneller Verlust (Abscherung) von CD62L von der Zelloberfläche statt, und dadurch wird die Zellmigration aus dem Immunorgan nahezu vollständig verhindert. Die auf der Partikeloberfläche gebundenen HEL-Moleküle können die Kreuzvernetzung der Antigen-spezifischen B-Zellrezeptoren bewirken, was wiederum die Kaskade von aktivierten B-Zellen auslöst (Abb. 92).

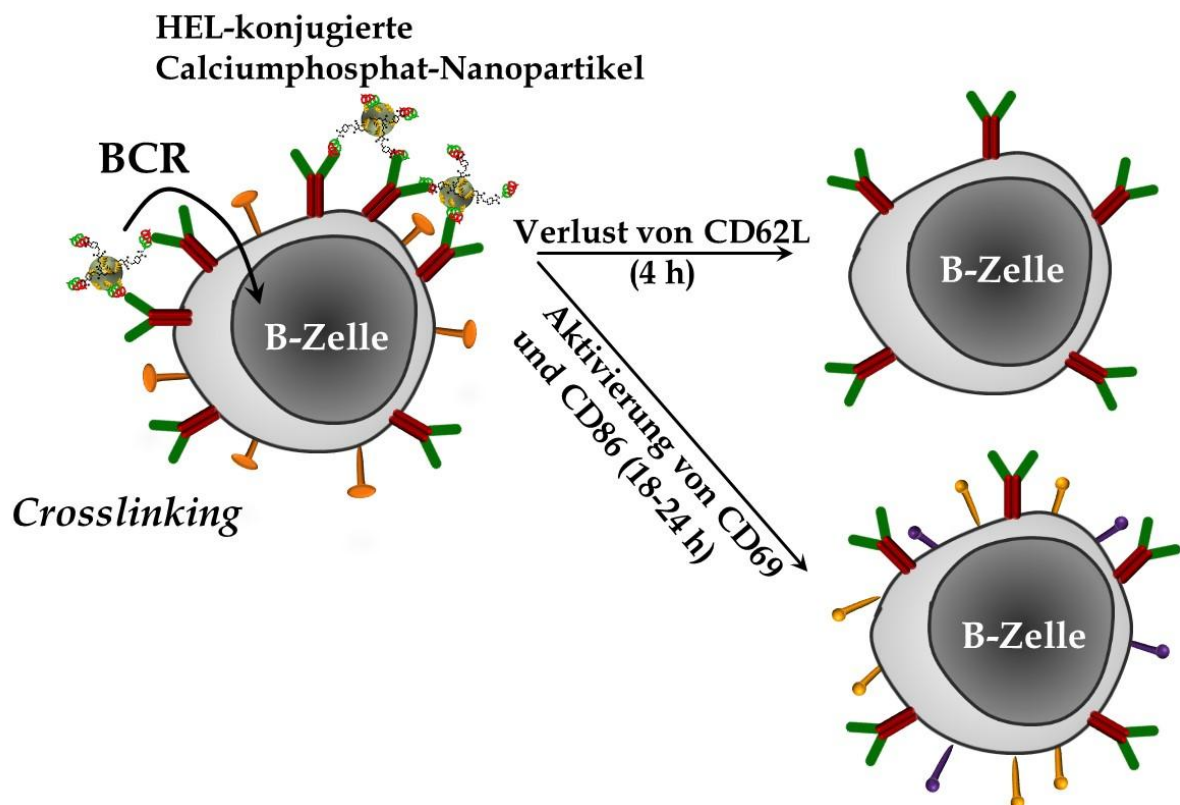


Abb. 92: Schematische Darstellung der Antigen-spezifischen Kreuzvernetzung (*crosslinking*) der B-Zellrezeptoren (BCR) durch die HEL-konjugierten Calciumphosphat-Nanopartikel.

Die Untersuchungen der Abscherung von CD62L von der Oberfläche der SW-HEL RAG⁺ und BL6 B-Zellen erfolgte mittels Durchflusszytometrie in Folge einer Inkubation mit HEL- (Antigen-spezifisches Protein) und BSA- (Kon-

trolle) konjugierten Calciumphosphat-Nanopartikeln, sowie mit dem löslichen monovalenten HEL (Abb. 93A). Die durchflusszytometrisch ermittelten Daten zeigen eine Abscherung von CD62L von der Oberfläche der SW-HEL B-Zellen nur nach der Inkubation mit Antigen-spezifischen Calciumphosphat-Partikeln (Abb. 93A). Die Abscherung von CD62L kann erst nach der Bindung/Internalisierung von HEL-konjugierten Calciumphosphat-Partikeln festgestellt werden. Die BSA-konjugierten Nanopartikel wirken nicht auf die CD62L-Abscherung von der Oberfläche der SW-HEL und BL6 B-Zellen (Abb. 93). Das lösliche monovalente HEL induziert ebenfalls keinen CD62L-Verlust von HEL-spezifischen B-Zellen.

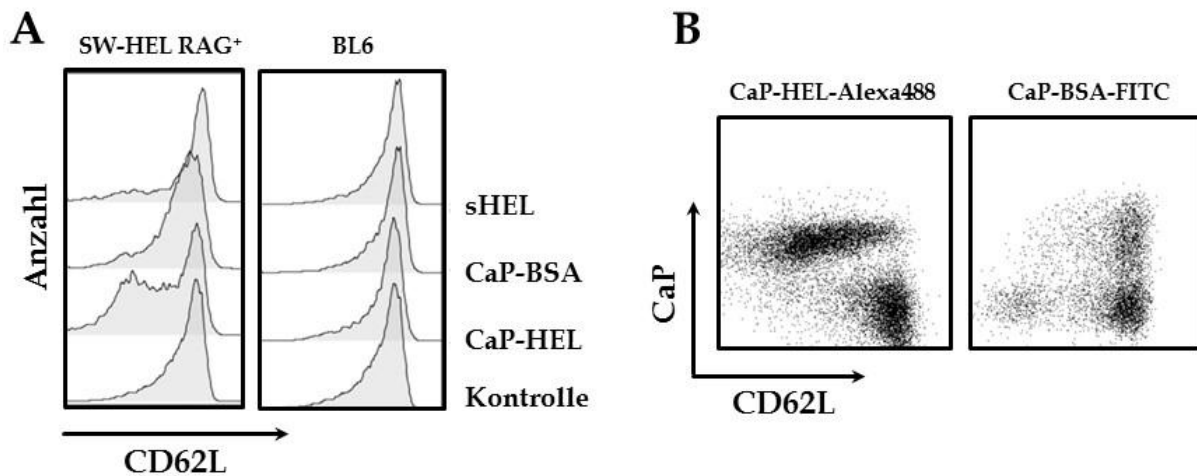


Abb. 93: BCR-spezifische Abscherung von CD62L bei Antigen-spezifischen B-Zellen. **A:** Milzzellen von SW-HEL RAG⁺ (*links*) und BL6- (*rechts*) Mäusen wurden mit HEL-Alexa488- oder BSA-FITC-konjugierten Nanopartikeln (1 μ L der Partikel pro 200 μ L der Zellsuspension) sowie mit dem löslichen HEL-Alexa488 (0,1 μ g pro 200 μ L Zellsuspension) für 18 Stunden bei 37 °C inkubiert. **B:** CD62L-Abscherung von SW-HEL RAG⁺ B-Zellen in Abhängigkeit von der Bindung der Protein-konjugierten Calciumphosphat-Nanopartikel.

3.8.5 Aktivierung der Antigen-spezifischen B-Zellen

Die Kreuzvernetzung der B-Zellrezeptoren durch ein spezifisches Antigen soll zur Aktivierung und Proliferation der B-Zellen führen. Zur Verifizierung der erhaltenen Ergebnisse wurde die Aktivierung der B-Zellen mit Antigen-spezifischen und Kontrollpartikeln im Vergleich zu dem monovalenten Antigen und zu den Lipopolysacchariden (LPS) untersucht. Die HEL-konjugierten Calciumphosphat-Nanopartikel induzieren die Dosis-abhängige Expression des frühen Aktivierungsmarkers CD69 und des kostimulatorischen Moleküls CD86 auf der Oberfläche der SW-HEL B-Zellen (Abb. 94).

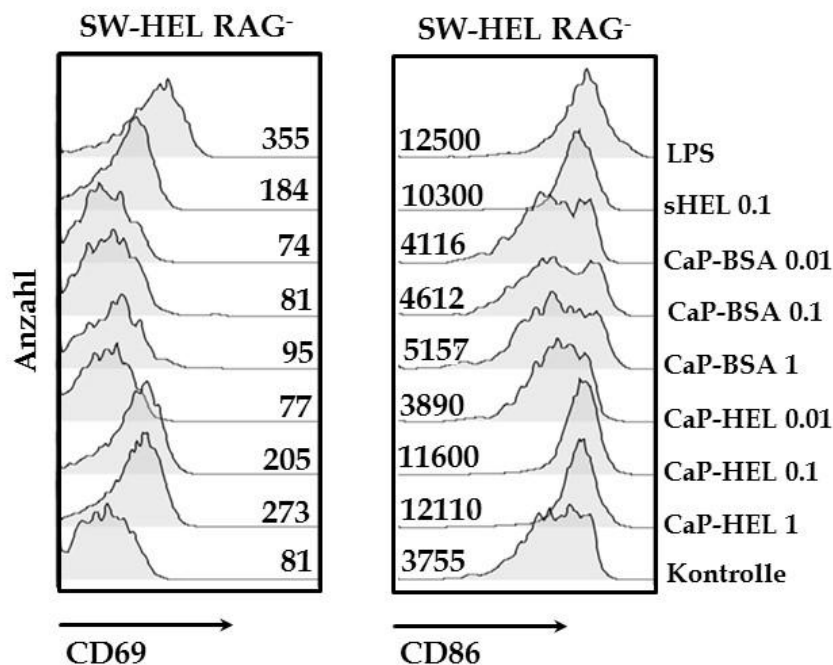


Abb. 94: Aktivierung der B-Zellen von SW-HEL-Mäusen. Naive B-Zellen wurden von SW-HEL RAG⁻ Mäusen isoliert und mit Protein-konjugierten Calciumphosphat-Nanopartikeln (HEL oder BSA), löslichem HEL (2 µg pro 200 µL der Zellsuspension) und LPS (1 µg pro 200 µL der Zellsuspension) für 24 h inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen mit anti-B220, CD69 und CD86 Antikörpern gefärbt.

In den durchgeführten Experimenten konnten das Antigen-spezifische Targeting und die primäre Aktivierung der naiven B-Zellen *in vitro* gezeigt werden. Zusammenfassend stellen die entwickelten Calciumphosphat-Nanopartikel ein Trägersystem dar, welches für verschiedene Vakzinierungs-

strategien weiter modifiziert werden kann. Obwohl Antikörperantworten in Abwesenheit von TLR-Signalen ausgelöst werden können,²¹⁹ können die Calciumphosphat-Nanopartikel mit verschiedenen TLR-Liganden beladen werden, um die Antigen-spezifische Immunantwort in unterschiedlichen B-Zell-Subpopulationen zu modulieren.^{220, 221}

Diese Zelleexperimente wurden von Herrn Dr. V. Temchura, Institut für Virologie, Ruhr-Universität Bochum, Bochum, AG Prof. K. Überla, durchgeführt.

3.9 miRNA-beladene Nanopartikel zur Stummschaltung von Survivin in Neuroblastomen

Das Neuroblastom ist ein pädiatrischer Krebs aus Vorläuferzellen des sympathischen Nervensystems, das eine extreme Heterogenität im klinischen Verhalten anzeigt, von spontaner Regression bis zu schneller Progression und Tod durch Krankheit.²²² Das Neuroblastom, der häufigste extrakranielle Tumor des Kindesalters, hat eine langfristige Überlebensrate von nur 15 %. Zum Zeitpunkt der Diagnose von Neuroblastomen sind Metastasen, Verstärkung des MYCN (*v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene neuroblastoma derived homolog*) und Onkogene zu finden.²²³⁻²²⁶ MYCN Verstärkung, die Verstärkung des 17q Chromosoms und die Zerstörung des 1p Chromosoms sind die am häufigsten vorkommenden genetischen Anomalien im Neuroblastom. Alle korrelieren mit einer schlechten Prognose.²²⁷ BIRC5 (Survivin) ist eines der Gene, das auf dem Chromosom 17q liegt. Survivin ist ein Mitglied aus der Familie der Inhibitoren der Apoptose-Proteine (IAP) und wird im Wesentlichen nur in Malignomen und nicht im Normalgewebe hochreguliert.^{227, 228} Die Stummschaltung von Survivin führt zur Induktion der Apoptose und zur Regulierung der Zellteilung.²²⁹

3.9.1 Zielerkennung und regulatorische Funktionen von miRNA

MikroRNAs (miRNAs) sind kleine nicht-kodierende RNAs mit einer Länge von 18 bis 25 Nukleotiden (nt), die die Genexpression auf der posttranskriptionellen Ebene regulieren.²³⁰⁻²³² Man nimmt an, dass insgesamt über 30 % der Gentranskripte durch miRNAs reguliert werden.²³³ Sie sind an der Regulation mehrerer biologischer Prozesse beteiligt, einschließlich Zellzyklus, Differenzierung, Proliferation, Apoptose und Immunregulation, sowie Krankheiten wie Diabetes, Immun- oder neurodegenerativen Erkrankungen und Krebs.^{230, 231, 234-236} Die miRNA-Synthese beinhaltet die Transkription im

Zellkern, den Export ins Zytoplasma und dort die Prozessierung und Reifung (Abb. 95).

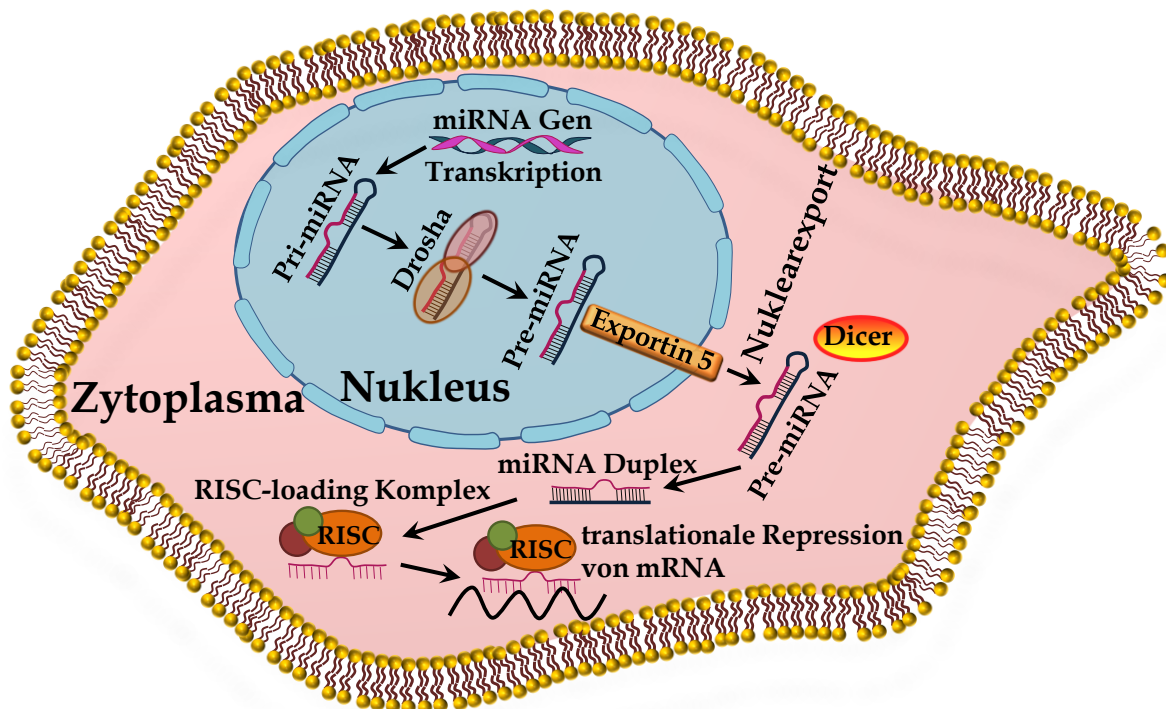


Abb. 95: MikroRNA-Biogenese in Zelle.

Die Transkription der miRNAs wird durch die RNA Polymerase II vermittelt. Es entsteht ein langes primäres miRNA-Transkript (pri-miRNA), das anschließend durch das Enzym Drosha zu einer ~70-80 Nukleotid großen „precursor microRNA“ (pre-miRNA) im Kern prozessiert wird.^{230, 231} Die pre-miRNAs werden dann durch Exportin-5 vom Zellkern ins Zytoplasma exportiert. Im Zytoplasma wird schließlich die Schleife der pre-miRNA durch das RNase III-Enzym Dicer abgeschnitten, sodass eine 18-25 Nukleotide lange, doppelsträngige miRNA-Duplex-Struktur verbleibt. Der reife miRNA-Strang des miRNA-Duplexes wird dann in den RNA-induced silencing complex (RISC) aufgenommen.^{232, 237} Der entstandene miRNA-RISC Komplex kann an die 3'-untranslatierten Regionen (UTR) von mRNAs binden und so zur Genstumschaltung des Proteins durch translationale Repression beitragen. Wenn es eine perfekte Komplementarität mit der 3'-UTR der Ziel-mRNAs entsteht, so kann dies auch zu einem Abbau von mRNA führen.^{231, 232}

Je nach Zielgen und Expressionsniveau können miRNAs entweder als Tumorsuppressoren oder als Onkogene fungieren und bei der Förderung oder Unterdrückung von Krebswachstum und der Progression helfen.²³⁸ Diese biologischen Eigenschaften der miRNAs werden als diagnostische und prognostische Methode in verschiedenen Krebsarten verwendet, u.a. im Neuroblastom. Mestdagh *et al.* zeigten, dass der miR-17-92 Cluster als Onkogene im Neuroblastom wirkt.²³⁹ In Arbeiten von Schulte *et al.* wurde die unterschiedliche Expression von miR-542 im Tumor der späteren Stadien im Vergleich zu den früheren Stadien vom Neuroblastom festgestellt.²⁴⁰ Außerdem zeigten Yoon *et al.*, dass mRNA- und Protein-Ebenen von Survivin in miR-542-3p-transfizierten Zelllinien reduziert wurden.²⁴¹

3.9.2 Charakterisierung der miRNA-beladenen Nanopartikel

Die erfolgreiche Anwendung der Calciumphosphat-Nanopartikel als Trägersystem für Nukleinsäuren wurde in Kapitel 3.5.2 beschrieben.

Die miRNA-beladenen Calciumphosphat-Nanopartikel wurden nach der von Sokolova *et al.* etablierten Synthese hergestellt.^{43, 133} Die schematische Darstellung der Nanopartikel ist in Abbildung 96 gezeigt. Die äußere Beschichtung der miRNA-beladenen Partikel mit einer PEI-Schale soll eine verbesserte Stabilität und Transfektionseffizienz der synthetisierten Calciumphosphat-Nanopartikel aufweisen. Die Partikel wurden mit zwei miRNA-Arten funktionalisiert. Um einen positiven Wirkungseffekt von Calciumphosphat-Nanopartikeln zu testen, wurden die Partikel mit miR-542-3p beladen. Als Negativkontrolle wurde Negativkontroll-miRNA (NK-miRNA) für die Partikelsynthese verwendet.

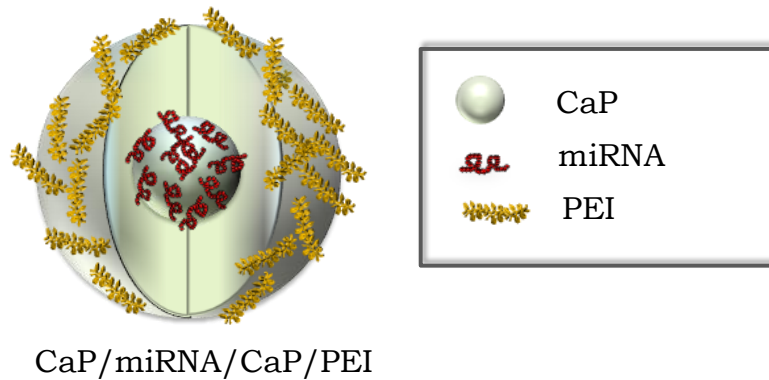


Abb. 96: Schematische Darstellung der miRNA-beladenen Calciumphosphat-Nanopartikel.

REM-Aufnahmen der miR-542-3p- und NK-miRNA-beladenen Calciumphosphat-Nanopartikel sind in Abbildung 97 gezeigt. Es lassen sich kugelförmige Nanopartikel mit Durchmessern von weniger als 200 nm (70-180 nm) erkennen. REM-Aufnahmen zeigen keinen Unterschied in der Morphologie und Größe zwischen den miR-542-3p- und NK-miRNA-beladenen Partikeln (Abb. 97). Die äußere PEI-Schale gewährleistet eine positive Ladung der beiden Partikelarten.¹³³

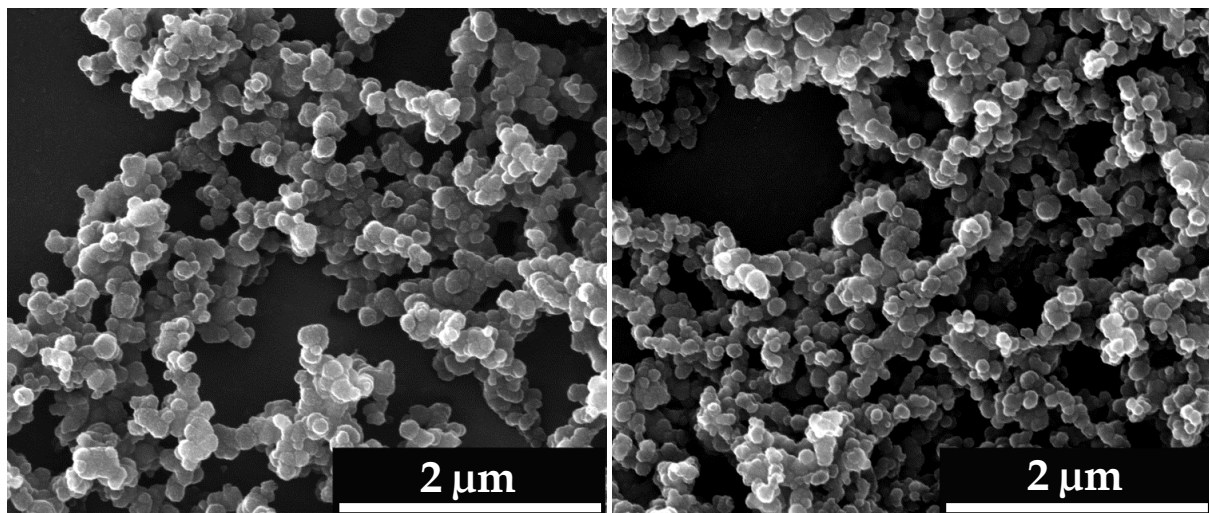


Abb. 97: REM-Aufnahmen der miR-542-3p- (*links*) und NK-miRNA- (*rechts*) beladenen dreischaligen Calciumphosphat-Nanopartikel.

3.9.3 *In vivo* Ergebnisse der miRNA-beladenen Nanopartikel

Um die Expression von miR-542-3p im Neuroblastom-Heterotransplantat zu erneuern und die tumorsuppressive Funktion²⁴¹ der verwendeten miRNA zu analysieren, wurden die miR-542-3p-beladenen Calciumphosphat-Nanopartikel *in vivo* getestet.

Zur Untersuchung des Effekts von miRNA-beladenen Nanopartikeln auf Neuroblastomzellen, die als Xenografts in nu/nu Mäusen (6 Wochen alt, männliche Athymic Mäuse) wuchsen, wurden Xenograft-tragende Mäuse sowohl mit miR-542-3p-beladenen Calciumphosphat-Nanopartikeln als auch mit Kontrollpartikeln behandelt und die Leber sowie die Tumoren analysiert. Die Expression von miRNA-542-3p wurde mittels qPCR (Real-Time-quantitative Polymerase-Kettenreaktion) gemessen und gegen die Expression des Referenzgens RNU6B²⁴² normalisiert. Die miR-542-3p Expression der Tumore wurde im Vergleich zur Expression der mit Kontrollpartikeln behandelten Tumoren aufgetragen. Die erhaltenen Werte der miR-542-3p Expression zeigen, dass die Expression von miR-542-3p im Tumor nach der Behandlung der Xenograft-tragenden Mäuse mit miR-542-3p-beladenen Calciumphosphat-Nanopartikeln im Vergleich zu Kontrollpartikeln durchschnittlich 26-fach erhöht wird (Abb. 98).

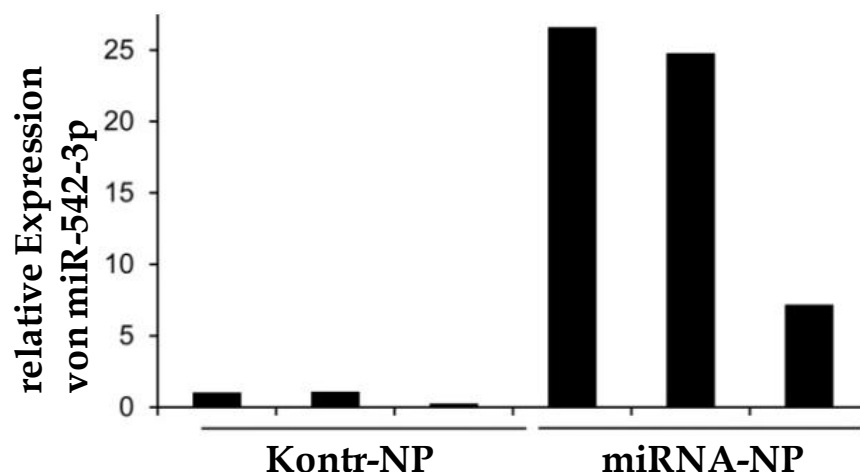


Abb. 98: Expression von miR-542-3p in Neuroblastom-Xenografts *in vivo*. qPCR-Daten nach der Behandlung der Xenograft-tragenden Mäuse mit miR-542-3p- und NK-miRNA-beladenen Calciumphosphat-Nanopartikeln.

Die Funktionalität der in Tumoren exprimierten miR-542-3p wurde anhand der Expression des Targets Survivin gemessen. Die Expression von Survivin in Tumoren wurde mittels Western Blot (WB)-Analyse untersucht. Eine reduzierte Expression von Survivin konnte in mit miR-542-3p-beladenen Calciumphosphat-Nanopartikeln behandelten Tumoren gezeigt werden (Abb. 99, miRNA-NP). Die Behandlung der Xenograft-tragenden Mäuse mit Kontrollpartikeln zeigt keine Herunterregulation von Survivin (Abb. 99, Kontr-NP).

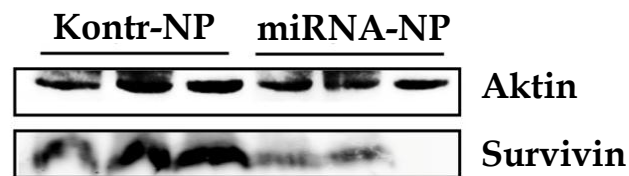


Abb. 99: Herabregulation von Survivin mittels miRNA-beladenen Calciumphosphat-Nanopartikeln in Neuroblastom-Xenografts *in vivo*. Western Blot (WB)-Analyse von Survivin in Tumoren nach der Behandlung der Xenograft-tragenden Mäuse mit miR-542-3p- und NK-miRNA-beladenen Nanopartikeln. Aktin wurde als Ladungskontrolle für eine korrekte Übertragung der Proteine auf die Membran während des Western Blottens verwendet.

Die tumorsuppressive Wirkung der miR-542-3p Expression wurde mit Hilfe der histologischen Schnitte von Tumoren analysiert. Eine Hämotoxylin-Eosin-Färbung (H&E) wurde zur Auswertung der allgemeinen Morphologie von Neuroblastom-Xenografts verwendet. Die Färbung zeigt die Neuroblastom-spezifischen klein-, blau- und rundzelligen Tumore, die den Xenograft bilden (Abb. 100, H&E). Weiterhin wurden die Tumorschnitte zur Auswertung der Proliferation und der Apoptose in Neuroblastom-Xenografts nach der Behandlung mit miRNA-beladenen Nanopartikeln mit Mib-1 und gespaltener Caspase 3 angefärbt. Mib-1 ist ein Marker gegen Ki-67-Antigene der aktiv-proliferierende Zellen, und gespaltene Caspase 3 wird zur Detektion der apoptotischen Zellen verwendet. Ki-67-Antigene sind in proliferierenden Zellen vorhanden, während die ruhenden Zellen kein Ki-67-Protein exprimieren.²⁴³ Die immunhistochemische Bestimmung der Proliferation durch das Messen der Ki-67-Expression wird für die Auswertung des

biologischen Verhaltens des Tumors verwendet. Die immunhistochemische Färbung der Tumorschnitte zeigt, dass die Proliferation der Zellen nach der Behandlung der Xenograft-tragenden Mäuse mit 542-3p-beladenen Partikeln im Vergleich zu den Kontrollpartikeln wesentlich reduziert wird (Abb. 100, Mib-1; eine kleinere Anzahl der dunkel angefärbten Zellen, die Ki-67-Antigen exprimieren). Die mit miRNA-542-3p-beladenen Nanopartikeln behandelten Tumoren weisen einen höheren Anteil apoptotischer Zellen im Vergleich zu mit NK-miRNA-beladenen Partikeln behandelten Tumoren auf (Abb. 100, gespaltene Caspase 3).

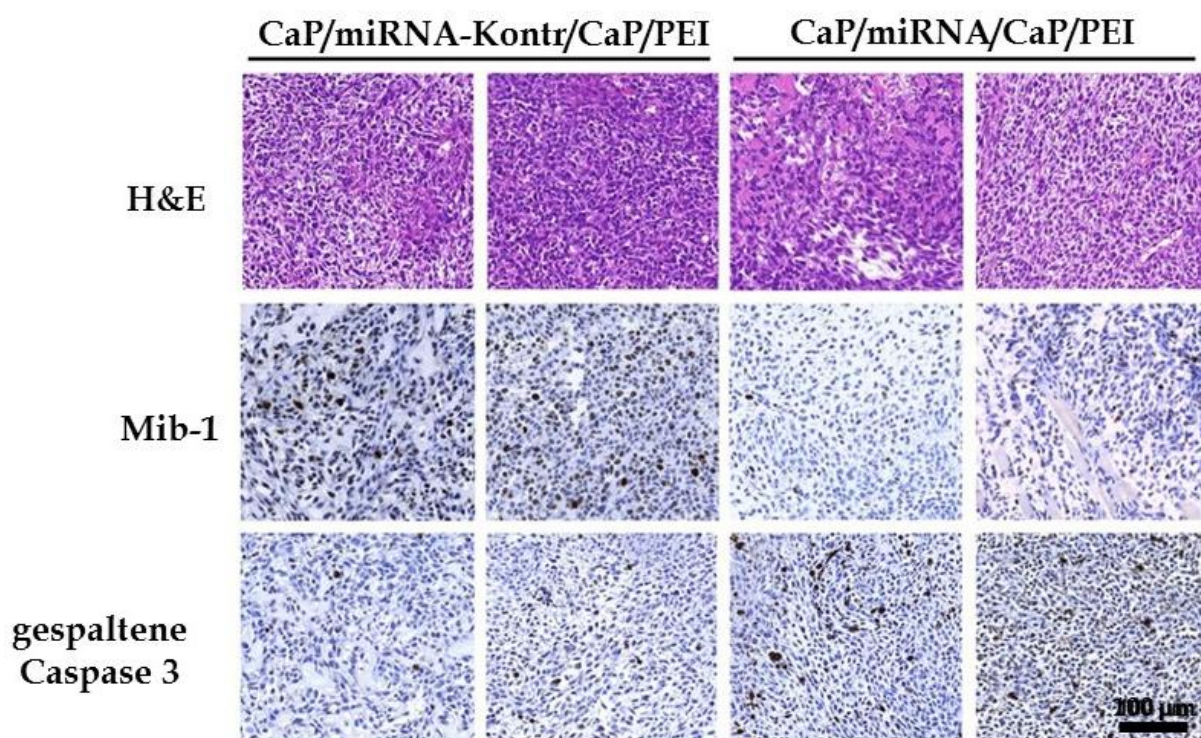


Abb. 100: Immunhistochemische Färbung der Tumorschnitte nach Behandlung der Neuroblastom-Xenografts mit miR-542-3p-beladenen Calciumphosphat-Nanopartikeln und mit Kontrollpartikeln. *H&E*: Hämatoxylin-Eosin-Färbung zu der Bewertung der allgemeinen Morphologie; *Mib-1* und *gespaltene Caspase 3* jeweils zu der Bewertung der Proliferation und der Apoptose in Xenografts.

Der Anteil der Mib-1 bzw. gespaltener Caspase 3-gefärbten Zellen wurde relativ zur Gesamtzellzahl von drei repräsentativen Ausschnitten jedes Tumors ausgezählt. Die Mittelwerte der mit miR-542-3p-beladenen Calciumphosphat-Nanopartikeln behandelten Tumore wurden gegenüber den Werten von Tumoren, die mit Kontrollpartikeln behandelt wurden, in Abbildung 101

zusammengestellt. Die Auswertung der immunhistochemischen Färbung ergibt, dass die Zellproliferation nach der Behandlung der Xenograft-tragenden Mäuse mit miR-542-3p-beladenen Calciumphosphat-Nanopartikeln um 85 % reduziert wird (Abb. 101, links). Der Anteil der apoptotischen Zellen wird in diesen Tumoren um den Faktor 2,9 erhöht (Abb. 101, rechts).

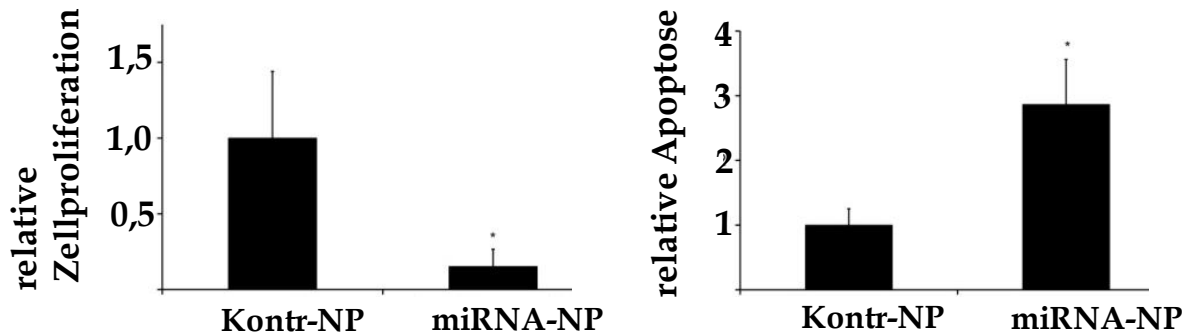


Abb. 101: Relative Zellproliferation und Apoptose in Tumorschnitten nach Behandlung der Xenograft-tragenden Mäuse mit miR-542-3p-beladenen Calciumphosphat-Nanopartikeln und mit Kontrollpartikeln (*p<0,05).

Die erhaltenen Ergebnisse zeigen, dass miR-542-3p-beladene Calciumphosphat-Nanopartikel eine erneute Expression von miRNA-542 in Neuroblastom-Xenografts *in vivo* erzeugen konnten. Die tumorsuppressive Funktion der erneut exprimierten miR-542-3p wurde durch die verringerte Proliferation und erhöhte Apoptose in Heterotransplantaten nachgewiesen.

Die *in vivo* Untersuchungen wurden von Frau Dr. K. Althoff, Pädiatrische Onkologie und Hämatologie, Universitäts-Kinderklinik Essen, AG Prof. A. Eggert, durchgeführt.

Materialien und Methoden

4.1 Synthese und Funktionalisierung der Calciumphosphat-Nanopartikel

4.1.1 PEI-stabilisierte Calciumphosphat-Nanopartikel

Polyethylenimin-stabilisierte Calciumphosphat-Nanopartikel (CaP/PEI) wurden in einem kontinuierlichen Prozess bei Raumtemperatur (RT) synthetisiert. Die Fällung erfolgte wie in Abbildung 6 (Kap. 3.1.1) gezeigt. Die Calciumlactat-Lösung (18 mmol L^{-1} , Merck, p.a.) und die Di-Ammoniumhydrogenphosphat-Lösung ($10,8 \text{ mmol L}^{-1}$, Merck, p.a.) wurden mit $0,1 \text{ M}$ NaOH-Lösung (Merck, p.a.) auf einen pH-Wert von 10 eingestellt. Die Konzentration vom PEI (Sigma-Aldrich, branched, MW = 25 kDa) betrug $2,0 \text{ g L}^{-1}$. Die Calcium- und Phosphat-Lösungen wurden mittels einer Peristaltikpumpe (5 mL min^{-1}) innerhalb einer Minute in eine 20 mL Wasservorlage zusammengepumpt. Gleichzeitig erfolgte die Zugabe der PEI-Lösung (7 mL min^{-1}) über eine weitere Pumpe. Die PEI-stabilisierten Partikel (CaP/PEI) wurden 20 min bei RT gerührt und für die weitere Funktionalisierung oder Beladung mit Biomolekülen verwendet.

Zur Charakterisierung des Feststoffs wurde die Dispersion für 30 min bei 66000 g zentrifugiert (Optima XL-I, Beckman-Coulter). Der Überstand wurde entfernt und das erhaltene Pellet an Luft getrocknet.

Für die Herstellung der fluoreszierenden Nanopartikel wurden PEI-Fluoreszein (2 g L^{-1} , Surflay Nanotec GmbH, branched, MW = 25 kDa) oder PEI-Cy5 (2 g L^{-1} , Surflay Nanotec GmbH, branched, MW = 25 kDa) verwendet. Die Synthese der fluoreszierenden Partikel erfolgte wie zuvor beschrieben.

4.1.2 SiO₂-modifizierte Calciumphosphat-Nanopartikel

Für die Silica-Schale wurde eine Mischung aus 20 mL Ethanol (EtOH; p.a., VWR), $25 \text{ }\mu\text{L}$ Tetraethoxysilan (TEOS; 98 %, Sigma-Aldrich) und $13 \text{ }\mu\text{L}$

Ammoniak-Lösung (30-33 %, Carl Roth) entsprechend dem Stöber-Prozess vorbereitet. Zu dieser Mischung wurden 5 mL der CaP/PEI-Nanopartikel Dispersion gegeben. Die Reaktion erfolgte für 16 h bei RT unter Rühren. Danach wurde die Dispersion für 30 min bei 66000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt. Das erhaltene Pellet wurde erst mit dem Spatel zerkleinert und in 5 mL Reinstwasser mit dem Ultraschalldisperser (UP50H, Hielscher, Ultrasound Technology, Sonotrode N7, Amplitude 70 %, Pulsdauer 0,8) für 15 s redispergiert.

Zur Charakterisierung des Feststoffs wurde das erhaltene Pellet bei RT getrocknet.

4.1.3 NH₂-funktionalisierte Calciumphosphat-Nanopartikel

Für eine Funktionalisierung mit Aminogruppen wurden 5 mL der CaP/PEI/SiO₂-Nanopartikel-Dispersion zu einer Mischung aus 20 mL Ethanol und 25 µL 3-Aminopropyltriethoxysilan (APTES; 99 %, Sigma-Aldrich) gegeben. Die Reaktion erfolgte für 8-10 h bei RT unter Rühren. Danach wurde die Dispersion bei den gleichen Bedingungen wie nach der SiO₂-Modifizierung aufgereinigt.

4.1.4 SH-funktionalisierte Calciumphosphat-Nanopartikel

Für die Funktionalisierung mit Thiolgruppen wurden 5 mL der CaP/PEI/SiO₂-Nanopartikel Dispersion zu einer Mischung aus 20 mL Ethanol und 25 µL 3-Thiolpropyltrimethoxysilan (MPS; 95 %, Sigma-Aldrich) gegeben. Die Reaktion erfolgte für 8-10 h bei RT unter Rühren. Danach wurde die Dispersion bei den gleichen Bedingungen wie nach der SiO₂-Modifizierung aufgereinigt.

4.1.5 FITC-konjugierte Calciumphosphat-Nanopartikel

Die CaP/PEI/SiO₂-NH₂-Nanopartikel wurden kovalent mit dem Farbstoff Fluoresceinisothiocyanat (FITC; Isomer I, >95 %, Merck) gekoppelt. Die

Isothiocyanat-Gruppen des Farbstoffs reagieren mit Aminogruppen der funktionalisierten Nanopartikel. Dafür wurden die CaP/PEI/SiO₂-NH₂-Nanopartikel nach der Zentrifugation in 10 mL EtOH redispergiert. Zu dieser Dispersion wurden 100 µL der FITC-Lösung in EtOH (1 mg mL⁻¹) gegeben. Die Konjugationsreaktion erfolgte für 18-20 h bei RT unter ständigem Rühren. Danach wurde die Suspension für 30 min bei 66000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt. Das erhaltene Pellet wurde mehrmals mit Wasser gewaschen, danach mit dem Spatel zerkleinert und in 5 mL Reinstwasser mit dem Ultraschalldisperser (Sonotrode N7, Amplitude 70 %, Pulsdauer 0,8) für 40 s redispergiert.

4.1.6 SNARF-konjugierte Calciumphosphat-Nanopartikel

Die CaP/PEI/SiO₂-NH₂-Nanopartikel wurden kovalent mit dem pH-sensitiven Marker SNARF-1 (SNARF®-1carboxylic acid, acetate, succinimidyl ester, Life Technologies) gekoppelt. Der Succinimidylester des pH-Markers reagiert mit Aminogruppen der funktionalisierten Nanopartikel. Für die Konjugation wurden 100 µL der SNARF-1-Lösung im DMSO (0,5 mg mL⁻¹) zu 5 mL der frisch hergestellten CaP/PEI/SiO₂-NH₂-Nanopartikel in Wasser gegeben. Die Konjugationsreaktion erfolgte für 18-20 h bei RT unter ständigem Rühren. Danach wurden die Partikel bei den gleichen Bedingungen wie nach der Konjugation mit FITC aufgereinigt.

4.1.7 DY-682-markierte Calciumphosphat-Nanopartikel

Die CaP/PEI/SiO₂-Nanopartikel wurden mit dem Farbstoff DY-682 für die *in vivo*-Bildgebung markiert. Die Markierung erfolgte durch Zugabe von 200 µL DY-682-N-Succinimidylester in DMSO (DY-682-NHS, Dyomics GmbH, 1 mg mL⁻¹) zu 10 mL der frisch hergestellten CaP/PEI/SiO₂-Nanopartikel in Wasser (in Kapitel 4.1.2 beschriebene Synthese) für 30 min bei RT unter ständigem Rühren. Für die Funktionalisierung mit Thiolgruppen wurde die Dispersion der DY-682-markierten Nanopartikel zu einer Mischung aus 40 mL Ethanol und 50 µL MPS gegeben. Die Reaktion erfolgte für 8-10 h bei

RT. Danach wurden die CaP/PEI/SiO₂/DY-682/SH-Nanopartikel für 30 min bei 66000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt. Das erhaltene Pellet wurde mehrmals mit Wasser gewaschen, danach mit dem Spatel zerkleinert und in 8 mL Reinstwasser mit dem Ultraschalldisperser (Sonotrode N7, Amplitude 70 %, Pulsdauer 0,8) für 15 s redispergiert.

Die Menge des gebundenen DY-682-Farbstoffs wurde mittels UV-Vis-Spektroskopie bestimmt.

Um die Stabilität der erhaltenen Dispersionen über einen längeren Zeitraum zu gewährleisten, wurden die Partikelsystem in Gegenwart von Trehalose lyophilisiert. Dafür wurden 15 mg D-(+) Trehalose Dihydrat (Sigma-Aldrich) zu 1 mL der Dispersion (CaP/PEI/SiO₂/DY-682/SH-Nanopartikel) gegeben und dann mit flüssigem Stickstoff eingefroren. Das System wurde für 48 h bei 0,31 mbar und -7 °C lyophilisiert.²⁴⁴ Durch Zugabe von 1 mL Wasser und kurzem Schütteln konnte die Ausgangsdispersion wieder erhalten werden.

4.1.8 DY-682-markierte und mTHPC-beladene Calciumphosphat-Nanopartikel

Die DY-682-markierten Calciumphosphat-Nanopartikel wurden im Weiteren mit dem Photosensibilisator 5,10,15,20-Tetrakis(3-hydroxyphenyl)chlorin (mTHPC) beladen. Für die Beladung wurden 200 µL der mTHPC-Lösung in 2-Propanol (1 mg mL⁻¹) zu 8 mL der frisch hergestellten CaP/PEI/SiO₂/DY-682/SH-Nanopartikel in Wasser (in Kapitel 4.1.7 beschriebene Synthese) gegeben. Die Partikeldispersion wurde für 1 h bei RT gerührt. Danach wurde die Dispersion für 30 min bei 66000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt. Das erhaltene Pellet wurde mehrmals mit Wasser gewaschen, mit dem Spatel zerkleinert und in 8 mL Reinstwasser mit dem Ultraschalldisperser (Sonotrode N7, Amplitude 70 %; Pulsdauer 0,8) für 15 s redispergiert.

Die an die thiofunktionalisierten Nanopartikel gebundene mTHPC-Menge wurde mittels UV-Vis-Spektroskopie bestimmt.

Die Lyophilisation der erhaltenen Dispersion verlief analog zu der in Kapitel 4.1.7 beschriebenen Methode.

4.1.9 RGD-konjugierte multifunktionelle Calciumphosphat-Nanopartikel

Für die kovalente Konjugation wurden 500 μL der RGDfK-Peptid Lösung in PBS (cyclo(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Lys), Trifluoracetatsalz, Bachem AG, 1 mg mL^{-1}) mit 250 μL des Crosslinkers Sulfo-SMCC (4-(N-maleimido-methyl)cyclohexane-1-carboxylic acid 3-sulfo-N-hydroxysuccinimide ester sodium salt, Sigma-Aldrich, p.a., 4 mM) Lösung in PBS für 3-4 Stunden bei RT aktiviert. Danach wurden 5 mL CaP/PEI/SiO₂/DY-682/SH/mTHPC Nanopartikel in Wasser (in Kapitel 4.1.8 beschriebene Synthese) zur Peptid-Lösung gegeben und für 24 h bei 4 °C reagieren gelassen. Nach der Konjugationsreaktion wurden die Nanopartikel durch Zentrifugieren für 15 min bei 14,500 g gereinigt und in 5 mL Wasser redispergiert (UP50H, Hielscher, Ultraschall Technologie, Sonotrode 2, Amplitude 70 %, 8 s). Mittels UV-Vis-Spektroskopie wurde die Endkonzentration von mTHPC in RGDfK-konjugierten Nanopartikeln bestimmt. Die Lyophilisation der erhaltenen Dispersion verlief analog zu der in Kapitel 4.1.7 beschriebenen Methode.

4.1.10 Plasmid-DNA-beladene Calciumphosphat-Nanopartikel

Die CaP/PEI-Nanopartikel (in Kapitel 4.1.1 beschriebene Synthese) wurden mit EGFP-DNA beladen. Die Plasmid-DNA (pcDNA3-EGFP) kodiert ein grün fluoreszierendes Protein, EGFP. Diese DNA wurde zuvor aus *E. Coli* Bakterien gewonnen und mittels Nucleobond® aufgereinigt (endotoxinfreie Plasmid-DNA, Macherey-Nagel, Düren). Die Beladung erfolgte durch Zugabe von 100 μL der EGFP-DNA-Lösung (1 mg mL^{-1}) zu 900 μL der frisch hergestellten CaP/PEI-Nanopartikel in Wasser für 30 min bei RT unter ständigem Rühren. Danach wurden EGFP-DNA-beladene CaP/PEI-Nanopartikel nach dem Stöber-Prozess mit Silica-Schale modifiziert. Zu der Mischung aus 4 mL EtOH, 5 μL TEOS und 2,6 μL Ammoniak-Lösung wurde

1 mL der CaP/PEI/DNA-Nanopartikel-Dispersion gegeben. Die Reaktion erfolgte für 16 h bei RT unter Rühren. Danach wurde die Dispersion für 30 min bei 66000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt. Das erhaltene Pellet wurde erst mit dem Spatel zerkleinert und in 1 mL Reinstwasser mit dem Ultraschalldispenser (Sonotrode N3, Amplitude 70 %, Pulsdauer 0,8) für 4 s redispergiert. Die Biomolekül-beladenen Nanopartikel sind empfindlicher und wurden für kürzere Zeit mit der Sonotrode behandelt. Für die Funktionalisierung mit Thiolgruppen wurde die Dispersion der CaP/PEI/EGFP-DNA/SiO₂-Nanopartikel zu einer Mischung aus 4 mL Ethanol und 5 µL MPS gegeben. Die Reaktion erfolgte für 8-10 h bei RT. Danach wurden die CaP/PEI/EGFP-DNA/SiO₂/SH-Nanopartikel für 30 min bei 66000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt. Das erhaltene Pellet wurde mehrmals mit Wasser gewaschen, danach mit dem Spatel zerkleinert und in 1 mL Reinstwasser mit dem Ultraschalldispenser (Sonotrode N3, Amplitude 70 %, Pulsdauer 0,8) für 5 s redispergiert.

Die Beladung und Aufreinigung der Nanopartikel mit mCherry-DNA, die ein rot fluoreszierendes Protein kodiert, erfolgte bei gleichen Bedingungen wie mit EGFP-DNA.

4.1.11 CpG-beladene Calciumphosphat-Nanopartikel

Die Beladung der CaP/PEI-Nanopartikel mit Farbstoff-markiertem CpG erfolgte folgendermaßen: zu 1 mL der frisch hergestellten CaP/PEI-Nanopartikel in Wasser (in Kapitel 4.1.1 beschriebene Synthese) wurden 100 µL der CpG*-Lösung (CpG*: Alexa 488-, Alexa 555- oder Alexa 647-markiertes CpG mit der Sequenz 5'-TCCATGACGTTTCCTGACGTT-3', Life Technologies, 0,4 mg mL⁻¹) gegeben. Die Partikeldispersion wurde für 30 min bei RT gerührt. Die Modifizierung mit Silica-Schale und Funktionalisierung mit Thiolgruppen der CaP/PEI/CpG*-Nanopartikel wurden bei gleichen Bedingungen wie mit EGFP-DNA (in Kapitel 4.1.10 beschriebene Synthese) durchgeführt.

4.1.12 Flagellin-beladene Calciumphosphat-Nanopartikel

Die CaP/PEI-Nanopartikel (im Kapitel 4.1.1 beschriebene Synthese) wurden mit einem in voller Länge rekombinanten Flagellin, SF (fliC von *Salmonella enterica* subsp., GenBank Accession No. 1070204; 55 kDa), oder einem Flagellin-Mutant, Δ L (54 kDa) als Negativkontrolle beladen. Die Beladung erfolgte durch Zugabe von 400 μ L der SF- (1 mg mL⁻¹) oder Δ L- (1 mg mL⁻¹) Lösung zu 3,6 mL der frisch hergestellten CaP/PEI-Nanopartikel in Wasser (in Kapitel 4.1.1 beschriebene Synthese) für 30 min bei RT unter ständigem Rühren. Danach wurden Flagellin-beladene CaP/PEI-Nanopartikel nach dem Stöber-Prozess mit der Silica-Schale modifiziert. Zu der Mischung aus 16 mL EtOH, 20 μ L TEOS und 11 μ L Ammoniak-Lösung wurden 4 mL der CaP/PEI/SF- oder CaP/PEI/ Δ L-Nanopartikel-Dispersion gegeben. Die Reaktion erfolgte für 16 h bei RT unter Rühren. Danach wurde die Dispersion für 30 min bei 66000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt. Das erhaltene Pellet wurde erst mit der Spatel zerkleinert, dann in 4 mL Reinstwasser mit dem Ultraschalldisperser (Sonotrode N7, Amplitude 70 %, Pulsdauer 0,8) für 20 s redispergiert. Die Beladungseffizienz des Proteins von 50 % in Nanopartikeln wurde gemäß der früheren Studien angenommen.⁸ Damit war die Proteinkonzentration 50 μ g mL⁻¹ in der Dispersion, das entspricht 0,91 μ M für SF und 0,93 μ M für Δ L.

4.1.13 Antikörper-konjugierte Calciumphosphat-Nanopartikel

Das Crosslinker Sulfo-SMCC (4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylic acid 3-sulfo-N-hydroxysuccinimide ester sodium salt, Sigma-Aldrich, p.a.) wurde für die Konjugation der Thiolgruppen der Nanopartikel mit Aminogruppen des Antikörpers verwendet. Dafür wurden 100 μ L der Antikörper-Lösung (1 mg mL⁻¹) mit 50 μ L der Sulfo-SMCC-Lösung in PBS (4 mM) gemischt und für 3-4 h bei RT unter Rühren reagieren gelassen. Nach der Reaktionszeit wurden 200 μ L der CaP/PEI/SiO₂-SH-Nanopartikel in Wasser (in Kapitel 4.1.4 beschriebene Synthese) zugegeben. Die Konjugationsreaktion erfolgte für 24 Stunden bei 4 °C. Zur Entwicklung dieser Synthese wurden die Antikörper anti-human-IgA, FITC-markierter Antikörper (Invitro-

gen), und anti-human-IgG1 Zytokeratin FITC-markierter Antikörper (Gene-Tex) verwendet.

Das Reaktionssystem wurde mittels Gelfiltration mit Sephadex G-25 (Grad "medium", Sigma-Aldrich) von den Eduktresten gereinigt. Dafür wurde 1 g des trockenen Gelfiltration Mediums für 5-6 h bei RT in Wasser gequollen. Danach wurde die Säule ($\varnothing_a = 3,5$ cm) mit diesem Gel gefüllt und mehrmals mit Wasser gespült. Das Reaktionsgemisch wurde in die Säule injiziert und mit 3-5 mL Wasser eluiert. Die Fraktionen wurden gesammelt (ca. 300 μ L jeder Fraktion) und weiter analysiert.

Analog zur Konjugation der CaP/PEI/SiO₂-SH-Nanopartikel wurden die DNA-Plasmid-beladenen (EGFP-DNA oder mCherry-DNA) Calciumphosphat-Nanopartikel (in Kapitel 4.1.10 beschriebene Synthese) mit dem anti-human-IgA, FITC-markierten Antikörper kovalent konjugiert und mittels Gelfiltration aufgereinigt.

Zur Untersuchung der selektiven Adressierung von dendritischen Zellen wurden die CaP/PEI/SiO₂-SH-Nanopartikel mit dem zellspezifischen anti-Maus-CD11c FITC-markierten Antikörper (clone N418; eBioscience) und dem Armenian hamster IgG FITC-markierten Kontrollantikörper (eBioscience) konjugiert. Das Konjugationsverfahren und die Aufreinigung erfolgten wie zuvor beschrieben.

4.1.14 Protein-konjugierte Calciumphosphat-Nanopartikel

Die thiofunktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikel wurden mit Proteinen kovalent konjugiert. Die Synthese der CaP/PEI/SiO₂/SH-Nanopartikel verlief analog der in Kapitel 4.1.4 beschriebenen Synthese. Die Nanopartikel wurden für 30 min bei 66000 g zentrifugiert und in 3 mL Reinstwasser (60 % des Ausgangsvolumens) mit dem Ultraschalldisperser (Sonotrode N7, Amplitude 70 %, Pulsdauer 0,8) für 15 s redispergiert.

Zur Untersuchung der selektiven Adressierung von naiven B-Zellen wurden die CaP/PEI/SiO₂-SH-Nanopartikel entweder mit einem Antigen-spezifischen HEL-Protein (*hen egg lysozyme*, Sigma) oder einem Kontrollprotein BSA (*bovine serum albumin*, Sigma-Aldrich) gekoppelt. Dafür wurden 133 μ L einer

1:1 Mischung von HEL-Alexa488 (Protein labeling kit, Invitrogen, 0,5 mg L⁻¹) und HEL (Gesamtkonzentration von HEL 0,75 mg mL⁻¹) mit 50 µL der Sulfo-SMCC-Lösung in PBS (4 mM) für 3-4 h bei RT aktiviert. Für das Kontrollprotein wurden 66,5 µL einer 1:4 Mischung von BSA-FITC (Sigma-Aldrich, 0,5 mg mL⁻¹) und BSA (Gesamtkonzentration von BSA 0,9 mg mL⁻¹) mit 50 µL der Sulfo-SMCC-Lösung in PBS (4 mM) für 3-4 h bei RT aktiviert. Nach der Reaktionszeit wurde 1 mL der CaP/PEI/SiO₂/SH-Nanopartikel zu jedem aktivierten Protein gegeben. Die Konjugation erfolgte für 24 Stunden bei 4 °C. Anschließend wurde das Reaktionssystem für 15 min bei 14500 g zentrifugiert (Heraeus Fresco 21). Der Überstand wurde entfernt. Das erhaltene Pellet wurde erst mit dem Spatel zerkleinert und in 1 mL Reinstwasser mit dem Ultraschalldisperser (Sonotrode N2, Amplitude 70 %, Pulsdauer 0,8) für 8 s redispergiert. Die an die thiolfunktionalisierten Nanopartikel gebundene Menge von HEL-Alexa488 oder BSA-FITC wurde mittels UV-Vis-Spektroskopie bestimmt.

4.1.15 Synthese der dreischaligen CpG-beladenen Calciumphosphat-Nanopartikel

Für die Synthese der dreischaligen CaP/CpG/CaP/CpG-Nanopartikel wurden die Lösungen von Calciumlactat (6,25 mmol L⁻¹, Merck, p.a., pH = 9,00) und Di-Ammoniumhydrogenphosphat (3,74 mmol L⁻¹, Merck, p.a., pH = 9,00) über eine Peristaltikpumpe mit maximaler Pumpgeschwindigkeit innerhalb einer Minute zusammengepumpt. Einige Sekunden nach der Fällung wurde 1 mL der CaP-Nanopartikel Dispersion entnommen und mit 0,2 mL einer 1:3 Mischung von CpG-Alexa488 (Alexa 488 markiertes CpG mit einer Sequenz 5'-TCCATGACGTTCTGACGTT-3', Life Technologies, 0,4 mg mL⁻¹) und CpG (0,4 mg mL⁻¹) stabilisiert. Für die zweite Schale wurden 0,5 mL der Calcium- und 0,5 mL der Phosphat-Lösung nacheinander gegeben. Anschließend erfolgte die Zugabe von 0,2 mL einer 1:3 Mischung CpG-Alexa488 und CpG. Die dreischaligen CaP/CpG/-CaP/CpG-Nanopartikel wurden für 30 min bei 66000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt. Das erhaltene Pellet wurde erst mit dem Spatel

zerkleinert und in 2,4 mL Reinstwasser mit dem Ultraschalldisperser (Sonotrode N3, Amplitude 60 %, Pulsdauer 0,8) für 10 s redispergiert. Die mittels AAS ermittelte Konzentration von Ca^{2+} betrug $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ im Überstand, entsprechend $135 \mu\text{g mL}^{-1}$ Calciumphosphat in der Dispersion (bezogen auf stöchiometrischen Hydroxylapatit, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$).

4.1.16 Synthese der dreischaligen miRNA-beladenen Calciumphosphat-Nanopartikel

Die Synthese der dreischaligen CaP/miRNA/CaP/PEI-Nanopartikel verlief analog der in Kapitel 4.1.15 beschriebenen Synthese. Die Lösungen von Calciumlactat ($6,25 \text{ mmol L}^{-1}$, Merck, p.a., pH = 9,00) und Di-Ammoniumhydrogenphosphat ($3,74 \text{ mmol L}^{-1}$, Merck, p.a., pH = 9,00) wurden über eine Peristaltikpumpe mit maximaler Pumpgeschwindigkeit innerhalb einer Minute zusammengepumpt. Einige Sekunden nach der Fällung wurden die CaP-Nanopartikel mit Pre-miRTM Negativkontrolle (Applied Biosystems, $10 \mu\text{M}$) oder Pre-miRTM miRNA-542-3p (Applied Biosystems, $10 \mu\text{M}$) unter sterilen Bedingungen funktionalisiert. Die miRNA-beladenen Partikel wurden durch eine zusätzliche Schale aus Calciumphosphat geschützt und anschließend mit verzweigtem PEI ($2,0 \text{ g L}^{-1}$, Sigma-Aldrich, branched, MW = 25 kDa) stabilisiert. Die Konzentration von Pre-miRTM und PEI betrugen jeweils $1,08 \mu\text{M}$ und $357 \mu\text{g mL}^{-1}$ in der Dispersion.

4.2 Zellbiologische Methoden

4.2.1 Kultivierung der sekundären Zelllinien

HeLa-Zellen wurden in DMEM mit 10 % fötalem Rinderserum (FBS), 100 U mL⁻¹ Penicillin sowie Streptomycin bei 37 °C unter 5 % CO₂-Atmosphäre kultiviert. Die Zellen mit einer Konfluenz von 70-90 % wurden dann zweimal mit PBS gewaschen und dann mit einer Trypsin-EDTA-Lösung versetzt, um die adhärierenden Zellen zu lösen. Diese Zellsuspension wurde dann zentrifugiert (Heraeus Multifuge X1R, 900 rpm, 3 min, RT) und der Trypsin-haltige Überstand entfernt. Anschließend wurden die Zellen in frischem Medium resuspendiert und in eine 25 mL-Zellflasche überführt.

4.2.2 Kryokonservierung der Zellen

Zur Kryokonservierung wurden die Zellen mit PBS gewaschen, trypsinisiert und anschließend zentrifugiert. Sie wurden dann in 1 mL Zellmedium mit 100 µL DMSO gegeben und in ein Kryoröhrchen gefüllt. Dieses wurde dann langsam im Verlauf von 24 h auf -80 °C abgekühlt und in flüssigem Stickstoff gelagert. Zum Auftauen wurden die Zellen schnell auf 37 °C erwärmt. Zur Vermeidung eines osmotischen Schocks wurde innerhalb der ersten 5 min Zellkulturmedium zugegeben. Die aufgetauten Zellen wurden dann zentrifugiert (Heraeus Multifuge X1R, 900 rpm, 3 min, RT) und in frischem Zellkulturmedium resuspendiert. Um die Reste an DMSO zu entfernen, wurde das Medium nach 12 h erneut gewechselt.

4.2.3 Zellaufnahmen der PEI-Farbstoff-stabilisierten Nanopartikel

Für mikroskopische Untersuchungen zur Aufnahme der CaP/PEI-Fluorescein/SiO₂/SH- und CaP/PEI-Cy5/SiO₂/SH-Nanopartikel wurden HeLa-Zellen verwendet. Die Zellen wurden 12 h vor den Aufnahme-Experimenten trypsinisiert und in eine 24-Well Platte mit einer Zelldichte von 5·10⁴ Zellen pro Well ausgesät. Für die Zellaufnahme wurden 500 µL des Zellkulturmediums mit 40 µL der CaP/PEI-Fluorescein/SiO₂/SH- oder

CaP/PEI-Cy5/SiO₂/SH-Dispersion versetzt und zur Zelllinie gegeben. Die Zellen wurden für 5 h bei 37 °C unter 5 % CO₂-Atmosphäre inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und mit wässriger Formaldehydlösung (4 %-ig) für 8 min bei RT fixiert. Nach der Fixierung wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und mit Triton X-100 (0,1 %-ig) für 10 min bei RT permeabilisiert. Nach der Permeabilisierung wurden die Zellen erneut zweimal mit PBS gewaschen und dann mit 300 µL einer 2 µg mL⁻¹ 4',6-Diamidin-2-phenylindol-Lösung (DAPI, Life Technologies) in PBS versetzt. Die Zellen wurden für 5 min bei 37 °C unter 5 % CO₂-Atmosphäre inkubiert. Nach der DAPI-Färbung wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und in PBS mit einem Fluoreszenzmikroskop (Carl Zeiss MicroImaging, Göttingen, Deutschland; 200-fache Vergrößerung) dargestellt.

4.2.4 Zellaufnahme der FITC-konjugierten Nanopartikel

Zur zellulären Aufnahme der FITC-konjugierten aminofunktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikel wurden HeLa-Zellen verwendet. Die Vorbereitung der Zellen zu den Aufnahmeuntersuchungen verlief analog der in Kapitel 4.2.3 beschriebenen Methode. Für die Zellaufnahme wurden 500 µL des Zellkulturmediums mit 40 µL der CaP/PEI/SiO₂/NH-FITC-Dispersion versetzt und zur Zelllinie gegeben. Die Zellen wurden für 5 h bei 37 °C unter 5 % CO₂-Atmosphäre inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und in PBS mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops analysiert.

4.2.5 Zellaufnahme der positiv und negativ geladenen Nanopartikel

Die HeLa-Zellen wurden 12 h vor den Aufnahmeexperimenten trypsinisiert und in eine 6-Well Platte mit einer Zelldichte von 1·10⁵ Zellen pro Well in 2 mL Zellkulturmedium ausgesät. Die folgenden Endkonzentrationen der Calciumphosphat-Nanopartikel pro Well wurden getestet: 2,30·10⁹ mL⁻¹; 3,57·10⁹ mL⁻¹; 5,17·10⁹ mL⁻¹ und 6,65·10⁹ mL⁻¹ für negativ geladene

CaP/CpG/CaP/CpG-Nanopartikel und $0,072 \cdot 10^9 \text{ mL}^{-1}$; $0,18 \cdot 10^9 \text{ mL}^{-1}$; $0,72 \cdot 10^9 \text{ mL}^{-1}$ und $1,77 \cdot 10^9 \text{ mL}^{-1}$ für positiv geladene CaP/PEI/SiO₂/NH-FITC-Nanopartikel. Die Zellen wurden für 3 h bei 37 °C unter 5 % CO₂-Atmosphäre inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und mit einer Trypsin-EDTA-Lösung für 5 min bei 37 °C inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden zentrifugiert und in 200 µL FACS-Lösung resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen durchflusszytometrisch analysiert (LSR II instrument, DIVA software, BD Biosciences).

4.2.6 Hemmung der Partikelaufnahme durch die Zugabe von Inhibitoren

Die hemmende Wirkung der verschiedenen Inhibitoren wurde durch die Aufnahme der negativ geladenen CaP/CpG/CaP/CpG- und positiv geladenen CaP/PEI/SiO₂/NH-FITC-Nanopartikel in HeLa-Zellen durchflusszytometrisch untersucht. Die Zellen wurden 12 h vor den Aufnahmeexperimenten trypsinisiert und in eine 6-Well Platte mit einer Zelldichte von $1 \cdot 10^5$ Zellen pro Well in 2 mL Zellkulturmedium ausgesät. Die Zellen wurden jeweils mit Wortmannin (100 ng mL^{-1}), LY294002 (20 µg mL^{-1}), Nocodazol (10 µg mL^{-1}), Chlorpromazin (1 µg mL^{-1}) oder Nystatin (10 µg mL^{-1}) für 30 min bei 37 °C unter 5 % CO₂-Atmosphäre preinkubiert. Danach wurden die Calciumphosphat-Nanopartikel (CaP/CpG/CaP/CpG: $5,17 \cdot 10^9$ Nanopartikel mL^{-1} oder CaP/PEI/SiO₂/NH-FITC: $0,72 \cdot 10^9$ Nanopartikel mL^{-1}) zugegeben und für 3 h bei 37 °C unter 5 % CO₂-Atmosphäre inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen dreimal mit PBS (4 °C) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen trypsinisiert, zentrifugiert, in 200 µL FACS-Lösung resuspendiert und mittels FACS analysiert. Die statistische Analyse der mittleren Fluoreszenz von behandelten Zellen im Vergleich zu den unbehandelten Zellen wurde mittels ANOVA im Sigmaplot durchgeführt.

4.2.7 Lokalisierung der SNARF-konjugierten Nanopartikel in Zellen

Die Endozytose der SNARF-konjugierten Nanopartikel durch HeLa-Zellen wurde mit konfokaler Laser-Scanning Mikroskopie (CLSM) untersucht. Die HeLa-Zellen wurden mit 40 μL der CaP/PEI/SiO₂/NH-SNARF-Dispersion in 500 μL DMEM mit 10 % FBS, 100 U mL⁻¹ Penicillin sowie Streptomycin zu $1 \cdot 10^5$ Zellen pro Kammer in Kammerdeckgläsern (BD Falcon™ Culture Slides, BD Biosciences) bei 37 °C unter 5 % CO₂-Atmosphäre für 3 h inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und mit wässriger Formaldehydlösung (4 %-ig) für 8 min bei RT fixiert. Nach der Fixierung wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und mit Triton X-100 (0,1 %-ig) für 10 min bei RT permeabilisiert. Die Lysosomen wurden für 15 min mit 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ anti-LAMP-1 (mouse anti-human CD107A/LAMP-1 FITC conjugate; Life Technologies) in PBS angefärbt. Nach der lysosomalen Anfärbung wurden die Zellkerne für 5 min mit 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ DAPI in PBS angefärbt. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und die Kammern von den Objektträgern entfernt. Die Objektträger wurden mit Eindeckmedium (Dako, Agilent Technologies) und Deckgläschen bedeckt und mit einem Zeiss LSM 510 Axiovert 200 konfokalen Laser-Scanning Mikroskop untersucht.

Für die Untersuchungen zur Kinetik der zellulären Aufnahme wurden die HeLa-Zellen mit SNARF-konjugierten Nanopartikeln für 3, 5, 13 und 25 h inkubiert. Während der letzten 30 min der Inkubation wurden die Zellkerne mit 10 μL DAPI (50 $\mu\text{g mL}^{-1}$) in PBS angefärbt. Nach der Inkubation wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und die Kammern von den Objektträgern entfernt. Die Objektträger wurden mit Eindeckmedium und Deckgläschen bedeckt und im CLSM untersucht.

4.2.8 Transfektion

Zur Transfektion durch EGFP-DNA-beladenen thioleffunktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikel wurden HeLa- und MG-63-Zellen verwendet. 12 h vor den Transfektionsversuchen wurden die Zellen trypsiniert und in Zellkultur-Platten ausgesiedelt. Die Anzahl an Zellen betrug $2,5 \cdot 10^4$ pro Well.

Für die Transfektion wurden 500 μL des Zellkulturmediums mit verschiedenen Mengen (20, 40, 80 und 100 μL) der CaP/PEI/DNA-EGFP/SiO₂/SH-Dispersion versetzt und zu den Zellen zugegeben. Die Transfektion mit Lipofectamin™ 2000 erfolgte gemäß der Herstellerangaben. Hierzu wurden 1 μg der Plasmid-DNA in 50 μL Medium ohne FBS in einem Well und 2 μL Lipofectamin™ in 50 μL Medium ohne FBS in den anderen Well gelöst. Nach einer kurzen Reaktionszeit von 3 min wurden die Mischungen zusammengegeben und für 15 min bei RT inkubiert. Dann wurden 100 μL der Transfektionssuspension zu den Zellen gegeben. Pro Transfektionsversuch wurde somit 1 μg DNA verbraucht. Nach 7 h Inkubation wurde das Medium durch frisches Zellkulturmedium ausgetauscht. Die Transfektionseffizienz wurde nach 72 h mit einem Fluoreszenzmikroskop bestimmt.

4.2.9 MTT-Test

Die Viabilität der Zellen nach der Transfektion oder nach Partikelaufnahme wurde mittels MTT-Test bestimmt. Dazu wurde MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid, Sigma) in PBS (5 m mL^{-1}) gelöst und mit Zellkulturmedium auf eine Konzentration von 1 mg mL^{-1} verdünnt. Das Zellkulturmedium der behandelten Zellen wurde durch 300 μL der MTT-Lösung ersetzt und die Zellen wurden für 1-2 h bei 37 °C unter 5 % CO₂-Atmosphäre inkubiert. Danach wurde die MTT-Lösung durch 300 μL DMSO ersetzt und für 30 min bei 37 °C unter 5 % CO₂-Atmosphäre inkubiert. Nach der Inkubation wurden 100 μL der Lösung entnommen und bei einer Wellenlänge von 570 nm photometrisch analysiert (Thermo Fisher Scientific, Vantaa, Finnland). Zur Bestimmung der Zellviabilität wurde die Absorption der behandelten Zellen auf die Kontrollzellen normalisiert.

4.2.10 Zellaufnahme der CpG-Farbstoff-beladenen Nanopartikel

Zur Untersuchung der zellulären Aufnahme von CaP/PEI/CpG*/SiO₂/SH-Nanopartikeln (CpG*: CpG-Alexa488, CpG-Alexa555 und CpG-Alexa647) wurden HeLa-Zellen verwendet. Die Vorbereitung der Zellen für Aufnahmeuntersuchungen verlief analog zu der in Kapitel 4.2.7 beschriebenen

Methode. Die Aufnahmen wurden mit einem Leica TCS SP5 konfokalen Laser-Scanning Mikroskop aufgenommen.

4.2.11 DY-682-markierte Nanopartikel zur *in vitro* und *in vivo* Studien

Die Aufnahme der DY-682-markierten Nanopartikel durch HeLa-Zellen wurde mit dem Fluoreszenzmikroskop untersucht. HeLa-Zellen wurden mit 80 μL der CaP/PEI/SiO₂/DY-682/SH-Dispersion in 1 mL Zellmedium zu $1 \cdot 10^5$ Zellen pro Kammer in Kammerdeckgläsern bei 37 °C unter 5 % CO₂-Atmosphäre für 5 h inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und mit wässriger Formaldehydlösung (4 %-ig) für 8 min bei RT fixiert. Die Aktin-Filamente wurden für 15 min mit dem Alexa-488-markierten Phalloidin (Invitrogen, Germany) in PBS angefärbt. Nach der Aktin-Färbung wurden die Zellkerne für 5 min mit 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ DAPI in PBS angefärbt. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und die Kammern von den Objektträgern entfernt. Die Objektträger wurden mit Eindeckmedium (Dako, Agilent Technologies) und Deckgläschen bedeckt und mit einem Keyence BZ-9000 Fluoreszenzmikroskop untersucht.

Die *in vivo*-Verteilung der CaP/PEI/SiO₂/DY-682/SH-Nanopartikel wurde in weiblichen athymischen nude-Foxn1^{nu} Mäusen (20-25 g, Harlan Laboratories GmbH, Venray, Niederlande) untersucht. Während der Experimente wurden die Tiere mit Isofuran (Actavis, München, Deutschland) anästhesiert. Anschließend wurden 200 μL der CaP/PEI/SiO₂/DY-682/SH-Dispersion intravenös in die Schwanzvene injiziert. In einem Zeitraster von 2, 4, 6, 8 und 24 h nach der Partikelinjektion wurden die Tiere mit einem MaestroTM *in vivo* Fluoreszenz-Imaging System (Anregungsfilter: 670-710 nm, Emissionsfilter: 750 nm Langpass, CRi Inc., Woburn, MA, USA) untersucht. 24 h nach der Injektion wurden die Tiere getötet und die Fluoreszenz der Organe *ex vivo* mittels MaestroTM *in vivo* Fluoreszenz-Imaging-System untersucht.

4.2.12 DY-682-markierte und mTHPC-beladene Nanopartikel

Die zelluläre Aufnahme der mTHPC-beladenen und DY-682-markierten Nanopartikel durch Tongue-Plattenkarzinom-Zellen (CAL-27) wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Die CAL-27-Zellen wurden mit der CaP/PEI/SiO₂/DY-682/SH/mTHPC-Dispersion in DMEM mit 10 % FBS bei 37 °C unter 5 % CO₂-Atmosphäre für 24 h inkubiert. Die Zellkerne wurden mit 0,2 µg mL⁻¹ Hoechst-33258 (Applichem, Darmstadt, Deutschland) angefärbt und mit einem EVOS Fluoreszenzmikroskop (AMG, Bothell, WA, USA) abgebildet.

Für die Untersuchungen der *in vivo*-Verteilung von CaP/PEI/SiO₂/DY-682/SH-Nanopartikeln wurden 1·10⁶ CAL-27-Zellen in Matrigel (BD, Heidelberg, Deutschland) subkutan in weibliche athymische nude-Foxn1^{nu} Mäuse injiziert. Sobald die Tumoren einen Durchmesser von ca. 5 mm erreicht hatten, wurden den Mäusen 200 µL der CaP/PEI/SiO₂/DY-682/SH/-mTHPC-Dispersion intravenös in die Schwanzvene injiziert. In einem Zeitraaster von 2, 4, 6, 8, 24, 30, 48, 54, 72 78, 96 und 1 W und 5 h nach der Partikelinjektion wurden die Tiere mit einem MaestroTM *in vivo* Fluoreszenz-Imaging untersucht. Eine Woche und fünf Stunden nach der Injektion wurden die Tiere getötet und die Fluoreszenz des Tumors und der Organe mit einem MaestroTM *in vivo* Fluoreszenz-Imaging System *ex vivo* gemessen.

4.2.13 PDT der Xenograft-tragenden Mäuse nach Behandlung mit multimofunktionellen Nanopartikeln

RGD-konjugierte multifunktionelle Calciumphosphat-Nanopartikel wurden in CAL-27 Tumor-tragenden Mäusen intravenös injiziert. Die injizierte mTHPC-Menge betrug 100 µg pro kg Körpergewicht. Nach 24 h wurden die Tumoren mit einem 2 W 652 nm Ceralas PDT-Laser (Biolitec AG, Jena, Deutschland) einer Leistungsdichte von 0,1 W/cm² und einer Gesamtlichtdosis von 100 J/cm² bestrahlt.

4.2.14 Detektion der apoptotischen Zellen im Tumor nach PDT

Nach der PDT mit RGD-konjugierten multifunktionellen Nanopartikeln wurde die Apoptose mit DY-734-Annexin V, einem fluoreszierenden Marker mit hoher Affinität zum Phosphatidylserin auf apoptotischen Zellen, detektiert. Annexin V (Abcam, Cambridge, UK) wurde mit dem NIR-Farbstoff DY-734-NHS (Dyomics GmbH, Jena, Deutschland) konjugiert. Die Konjugation erfolgte im Kopplungspuffer für 2 h und anschließender Aufreinigung mittels Ultrazentrifugation.

Zur Detektion der apoptotischen Tumorzellen *in vivo* wurde DY-734-Annexin V (4 nmol pro kg Körpergewicht) intravenös in die PDT-behandelten Mäuse 2 Tage und 2 Wochen nach der Therapie injiziert. Die Fluoreszenzintensität in den Tieren wurde vor der Injektion von Annexin (-1 h) sowie 0, 2, 4, 6, 8, 24 und 48 h nach der Injektion mit einem Maestro™ *in vivo* Fluoreszenz-Imaging System (Anregungsfilter: 670-710 nm, Emissionsfilter: 750 nm Langpass) detektiert. Durch Subtraktion der Fluoreszenz des Muskels (Bereich im Hals des Tieres) von der Fluoreszenz des Tumors wurde der Fluoreszenzkontrast von Tumor zu Muskel berechnet. Der Fluoreszenzkontrast vor der Annexin-Injektion (-1 h) wurde von allen anderen Zeitpunkten abgezogen.

4.2.15 Vaskularisierung und Reduktion des Tumors nach PDT

Die Vaskularisierung des Tumors wurde mit Hilfe des Kontrastmittels IRDye® 800CW RGD (LI-COR® Biosciences, Lincoln, NE, USA) detektiert. Das Kontrastmittel bindet sich an das $\alpha_v\beta_3$ Integrin der Endothelzellen im Tumor. Das Kontrastmittel (40 nm pro kg Körpergewicht) wurde intravenös in die Mäuse vor der Therapie sowie in die PDT-behandelten Mäuse 1, 2 und 4 Wochen nach der Therapie injiziert. Die Fluoreszenz des Tumors wurde mit einem Maestro™ *in vivo* Fluoreszenz-Imaging System (Anregungsfilter: 670-710 nm, Emissionsfilter: 750 nm Langpass) 24 h nach der Injektion von IRDye® 800CW RGD detektiert.

Zur Kontrolle der Reduktion des Tumors wurde das Tumolvolumen vor der Behandlung sowie bis zu 4 Wochen nach der Behandlung mit einem

digitalen Messschieber gemessen und der Beziehung $V = \pi/6 \cdot \text{Länge} \cdot \text{Breite} \cdot \text{Höhe}$ ausgewertet. Gemäß des Volumens vor der Behandlung (0 Tage) wurde das relative Tumervolumen in Abhängigkeit von der Zeit nach der Behandlung berechnet.

4.2.16 *In vivo*-Verteilung von DY-734-Annexin V und IRDye® 800CW RGD

Die Bestimmung der *in vivo*-Verteilung der Apoptose- oder Vaskularisierung-detektierenden Proben wurde in PDT-behandelten Mäusen 4 Wochen und 14 Tage nach der letzten Injektion von DY-734-Annexin V und 24 h nach der letzten Injektion von IRDye® 800CW RGD durchgeführt. Nach den letzten *in vivo*-Aufnahmen wurden die Tiere getötet und die isolierten Organe sowie die Tumoren mit einem Maestro™ *in vivo* Fluoreszenz-Imaging System (Anregungsfilter: 670-710 nm, Emissionsfilter: 750 nm Langpass) *ex vivo* gemessen.

4.2.17 Biologische Untersuchungen der Antikörper-konjugierten Nanopartikel

Zur Untersuchung der zellulären Aufnahme der IgA-FITC- oder Zytokeratin-FITC-konjugierten Calciumphosphat-Nanopartikel wurden HeLa-Zellen verwendet. Die Untersuchungen wurden analog zu der in Kapitel 4.2.3 beschriebenen Methode durchgeführt. Die Aufnahmen wurden mit einem Fluoreszenzmikroskop angefertigt.

Für die Transfektionsexperimente der IgA-FITC-konjugierten und EGFP-DNA- oder mCherry-DNA-beladenen Calciumphosphat-Nanopartikel wurden HeLa-Zellen verwendet. Die Transfektionsversuche wurden analog zur in Kapitel 4.2.8 beschriebenen Methode durchgeführt.

Zum Nachweis der spezifischen Adressierung der anti-CD11c-konjugierten Calciumphosphat-Nanopartikel durch dendritische Zellen innerhalb einer Milzzellkultur wurden Milzzellen aus Balb/c Mäusen (8-10 Wochen, Harlan Winkelmann GmbH, Borcheln, Deutschland) isoliert und $2 \cdot 10^6$ Zellen pro

Well einer 48-Well Zellkulturplatte mit 40 μL der CaP/PEI/SiO₂-S-anti-CD11c-FITC- (spezifisch) oder CaP/PEI/SiO₂-S-anti-IgG-FITC- (Kontrolle) Nano-partikel in 400 μL IMDM mit 10 % FCS, 25 μmol 2-Mercaptoethanol und 100 U mL⁻¹ Penicillin sowie Streptomycin für 4 h und 8 h bei 37 °C unter 5 % CO₂-Atmosphäre inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen mehrfach mit PBS gewaschen, um anheftende Calciumphosphat-Nanopartikel zu entfernen und mit einem Allophycocyanin (APC)-markierten αCD11c -Antikörper gefärbt. Der prozentuale Anteil der für beide Fluorophore (FITC und APC) positiver dendritischen Zellen Population wurde mit einem Durchflusszytometer (LSR II instrument, DIVA software, BD Biosciences) bestimmt.

Zum Nachweis der spezifischen Bindung von anti-CD11c-konjugierten Calciumphosphat-Nanopartikeln durch positive CD11c dendritische Zellen nach intraperitonealer (i.p.) Injektion wurden 600 μL der CaP/PEI/SiO₂-S-anti-CD11c-FITC- (spezifisch) oder CaP/PEI/SiO₂-S-anti-IgG-FITC- (Kontrolle) Nanopartikel in naive Balb/c Mäuse injiziert. Nach 4 h wurden die Milzen präpariert, Milzzellen isoliert und gegen die Oberflächenmoleküle CD11c mit APC-markiertem αCD11c -Antikörper gefärbt. Der Anteil FITC- und APC-positiver dendritischen Zellen wurde durchflusszytometrisch bestimmt.

4.2.18 Stimulierung von IL-8 und IL-1 β durch Flagellin-beladene Nanopartikel *in vitro*

Zur Stimulierung der Produktion von IL-8 (Aktivierung TLR5 Signalweg) durch Zugabe der Flagellin-beladenen Calciumphosphat-Nanopartikel wurden humane kolorektale Adenokarzinom-Epithelzellen (Caco-2-Zellen) verwendet. Vor Beginn der Stimulationsversuche wurden Caco-2-Zellen mit einer Dichte von $1 \cdot 10^5$ Zellen pro Well einer 48-Well Zellkulturplatte ausgesät und in DMEM mit 10 % FBS und 100 U mL⁻¹ Penicillin sowie Streptomycin für 5 Tage bei 37 °C unter 5 % CO₂-Atmosphäre inkubiert. 12 h vor dem Experiment wurden die Zellen in Zellkulturmedium ohne FBS kultiviert und anschließend mit SF- (Flagellin) oder ΔL - (Flagellin-Mutant)

beladenen Calciumphosphat-Nanopartikeln sowie mit löslichem SF (Positivkontrolle) und ΔL (Negativkontrolle) in insgesamt 300 μL DMEM ohne FBS für 6 h bei 37 °C unter 5 % CO_2 -Atmosphäre stimuliert. Nach der Stimulation wurden die Überstände gesammelt und bei -70 °C für die IL-8-Messung gelagert. Die Detektion und Quantifizierung von IL-8 in Zellüberständen wurde mit Hilfe eines Sandwich-ELISA (ELISA kit, BD Biosciences) durchgeführt.

Zur Stimulierung der Produktion von IL-1 β (Aktivierung des Inflammasoms, NLRC4) durch die Zugabe der Flagellin-beladenen Calciumphosphat-Nanopartikel wurden primäre Knochenmarksmakrophagen (*bone marrow-derived macrophages*, BMDM) verwendet. Die BMDM wurden aus den Oberschenkelknochen von C57BL/6 Mäusen (6-8 Wochen, Beijing Laboratory Animal Research Center, Wuhan, China) isoliert und in RPMI 1640 mit 10 % FBS, 15 % L929 und nicht essentiellen Aminosäuren für 7 Tage bei 37 °C unter 5 % CO_2 -Atmosphäre kultiviert. 24 h vor den Stimulationsversuchen wurden BMDM mit einer Dichte von $8 \cdot 10^4$ Zellen pro Well einer 96-Well Zellkulturplatte ausgesät, dann mit 50 ng mL^{-1} LPS für 3 h preinkubiert und anschließend dreimal mit RPMI 1640 gewaschen. Danach wurden die Zellen mit unbeladenen, SF- (Flagellin) oder ΔL - (Flagellin-Mutant) beladenen Calciumphosphat-Nanopartikeln, sowie mit löslichem SF (Positivkontrolle) und ΔL (Negativkontrolle) in Zellkulturmedium für 6 h bei 37 °C unter 5 % CO_2 -Atmosphäre stimuliert. Zur Kontrolle wurden die Zellen mit SF+DOTAP (Roche Diagnostics) als Positivkontrolle oder mit ΔL +DOTAP als Negativkontrolle transfiziert. Nach der Stimulation wurden die Überstände gesammelt und bei -70 °C für die IL-1 β -Messung gelagert. Die Detektion und Quantifizierung von IL-1 β in Zellüberständen wurde mit Hilfe eines Sandwich-ELISA (ELISA kit, BD Biosciences) durchgeführt.

4.2.19 Stimulierung von IL-6 durch Flagellin-beladene Nanopartikel *in vivo*

Zur Stimulierung der Produktion von IL-6 wurden 200 μL der in 0,9 %-iger NaCl-Lösung verdünnten SF- oder ΔL -beladenen Calciumphosphat-

Nanopartikel (entsprechend 0,1 µg, 1 µg, 10 µg SF oder ΔL pro Maus) i.p. in C57BL/6 Mäuse injiziert. Zur Kontrolle wurden 200 µL der gleichen Konzentration von löslichem SF oder ΔL in 0,9 %-iger NaCl-Lösung, sowie der in 0,9 %-iger NaCl-Lösung verdünnten unbeladenen Calciumphosphat-Nanopartikeln und reiner 0,9 % Kochsalzlösung injiziert. Nach 4 h wurde Blut entnommen, Serum vorbereitet und bei -70 °C für die IL-6-Messung gelagert. Die Mäuse wurden nach dem Entbluten getötet und die Bauchhöhle mit 1 mL 0,9 %-iger NaCl-Lösung gespült. Die Spülflüssigkeit wurde für 10 min bei 2000 rpm und 4 °C zentrifugiert, die Überstände gesammelt und bei -70 °C für die IL-6-Messung gelagert. Die Detektion und Quantifizierung von IL-6 wurde mit Hilfe eines Sandwich-ELISA (ELISA kit, BD Biosciences) durchgeführt.

4.2.20 Biologische Untersuchungen der Protein-konjugierten Nanopartikel

Für die Zellexperimente wurden B-Zellen aus der Milz der C57BL/6J-Mäuse (BL6, 6-8 Wochen, Janvier, France) oder BCR-transgenen SW-HEL-Mäuse (ein Mäuse-Paar wurde von Dr. A. Freitas, The Lymphocyte Population Biology Unit, Pasteur Institute, France, erhalten) isoliert und in R10 Medium (RPMI 1640 mit 10 % FCS und 100 U mL⁻¹ Penicillin sowie Streptomycin) bei 37 °C unter 5 % CO₂-Atmosphäre kultiviert. Für die Untersuchungen der zellspezifischen Bindung der Protein-konjugierten Nanopartikel wurden B-Zellen mit einer Dichte von 0,5·10⁶ Zellen pro Well einer 96-Well Zellkultur-platte ausgesät und in R10 Zellkulturmedium für 1 h auf Eis gekühlt. Danach wurden verschiedene Mengen der HEL-Alexa488- oder BSA-FITC-konjugierten Nanopartikel, sowie lösliches HEL gegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen zweimal mit eiskaltem R10 Medium vorsichtig gewaschen, mit HEL-Alexa647, anti-CD3- und anti-B220-Antikörpern gefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert (LSR II instrument, DIVA software, BD Biosciences).

Für die Untersuchungen der zellulären Aufnahme der Protein-konjugierten Nanopartikel wurden B-Zellen für 1 h bei 37 °C vorgewärmt und an-

schließlich mit den verschiedenen Mengen der HEL-Alexa488- oder BSA-FITC-konjugierten Nanopartikel und dem löslichen HEL für 2 h bei 37 °C unter 5 % CO₂-Atmosphäre inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen zweimal mit PBS vorsichtig gewaschen, mit HEL-Alexa647, anti-CD3- und anti-B220-Antikörpern gefärbt und in zwei Teile aufgeteilt. Ein Teil wurde mit Trypsin-EDTA-Lösung (Biochrom AG, Deutschland) für 15 min bei 37 °C inkubiert und intensiv mit R10 Medium gewaschen, um anheftende Calciumphosphat-Nanopartikel zu entfernen. Der zweite Teil wurde mit PBS statt der Trypsin-EDTA-Lösung inkubiert. Anschließend wurden die behandelten Zellen durchflusszytometrisch bestimmt.

Zur Untersuchung der Abscherung von CD62L von der Oberfläche der B-Zellen wurden Milzzellen aus BL6- und BCR-transgenen SW-HEL-Mäusen isoliert und 1·10⁶ Zellen pro Well einer 96-Well Zellkulturplatte mit HEL-Alexa488- oder BSA-FITC-konjugierten Nanopartikeln und löslichem HEL in R10-Medium für 18 h bei 37 °C unter 5 % CO₂-Atmosphäre inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen gesammelt, mit HEL-Alexa647, anti-CD3-, anti-B220- und anti-CD62L-Antikörper (BD PharMingen, Heidelberg, Deutschland, eBioscience) gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert.

Zur Aktivierung der Oberflächenmarker wurden Milzzellen aus SW-HEL-Mäusen isoliert und 0,5·10⁶ Zellen pro Well einer 96-Well Zellkulturplatte jeweils mit HEL-Alexa488- oder BSA-FITC-konjugierten Nanopartikeln, löslichem HEL oder LPS in R10-Medium für 24 h bei 37 °C unter 5 % CO₂-Atmosphäre inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen gesammelt, mit HEL markiert und anschließend mit anti-CD3-, anti-B220-, anti-CD69- und anti-CD86-Antikörpern (BD PharMingen, Heidelberg, Deutschland, eBioscience) angefärbt, um die Aktivierung der Oberflächenmarker durchflusszytometrisch zu analysieren.

4.2.21 miRNA-beladene Nanopartikel zur Hemmung von Survivin in Neuroblastomen *in vivo*

Zur Untersuchung der Wirkung von miRNA-beladenen dreischaligen Calciumphosphat-Nanopartikeln wurden 1·10⁷ WAC II Neuroblastom-Zellen

in 200 μ L Matrigel (BectonDickinson) subkutan in männlichen athymischen NCR Mäusen (6 Wochen alt) injiziert. Sobald die Tumoren eine Größe von ca. 500 mm³ erreicht hatten, wurden den Mäusen 200 μ L der CaP/miRNA/-CaP/PEI- oder CaP/miRNA-Kontrolle/CaP/PEI-Dispersion intravenös in die Schwanzvene injiziert. 48 h nach der Injektion wurden die Tiere getötet, die Tumore entnommen und entweder für anschließende Analysen mittels RT-qPCR und Western Blot eingefroren oder mit Formalin fixiert und für weitere immunhistochemische Analyse in Paraffin eingebettet.

RT-qPCR wurde mit TaqMan® Fast Advanced Master Mix (Applied Biosystems) und StepOnePlus™ RT-PCR-System (Applied Biosystems) entsprechend der Anweisungen des Herstellers durchgeführt.

Zur Western Blot Analyse wurde das Tumorgewebe mit RIPA-Puffer (50 mM HEPES, 10 mM NaCl, 0,1 % SDS, 1 % Triton-X-100, 1 % NP-40, Roche komplette Protease Inhibitor Cocktail Tablets und Roche PhosSTOP Phosphatase Inhibitor Cocktail Tablets) für 30 min auf Eis lysiert. 50 μ g der Proteine wurden auf 12 % SDS-PAGE aufgetrennt und auf Amersham Hybond™-C Extra (GE Healthcare, Solingen, Deutschland) übertragen. Die Nitrozellulosemembranen wurden mit 5 % Milchpulver in TBS-T_{0,1} blockiert und mit primären Antikörpern gegen Survivin (Cell Signaling, Frankfurt am Main, Deutschland), Aurora-B (Cell Signaling) und GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, Millipore, Darmstadt) als Kontrolle, gefolgt von anti-Kaninchen-HRP (GE Healthcare) und anti-Maus-HRP (Abcam) für 1 h bei RT inkubiert. Die Proteine wurden mit Amersham ECL Plus™ Western Blot Detektionsreagenzien (GE Healthcare) visualisiert und mit einem UVchem Detektionsgerät (Biometra, Göttingen, Deutschland) analysiert.

Die Formalin-fixierten und in Paraffin eingebetteten Gewebeschnitte (5 μ m) wurden entparaffiniert und mit 200 μ L der spezifischen Retrieval-Lösung (pH=6,0; EnVision™; Dako, Hamburg, Deutschland) für 20 min bei 100 °C versetzt. Nach dem Abkühlen (20 min) wurden die Objektträger mit Gewebeschnitten mit 3 % H₂O₂ für 5 min abgeschreckt. Anschließend wurden die Gewebeschnitte mit Caspase 3 (Cell Signaling) und Mib-1 (Dako) Antikörpern mittels Dako Autostainer (Dakocytomation, Hamburg, Deutschland) gefärbt und mittels EnVision™ (Dako) visualisiert.

4.3 Physikochemische Methoden

4.3.1 Dynamische Lichtstreuung und Zetapotential

Die Dynamische Lichtstreuung (DLS) ist eine Messmethode zur Bestimmung der hydrodynamischen Radien von Partikeln oder Molekülen in Dispersion. Die Messung der Partikelgröße basiert auf der Erfassung der Brown'schen Molekularbewegung in der Probe. Die Probe wird mit einem monochromatischen Laserlicht bestrahlt. Wenn ein Laserstrahl auf ein Teilchen trifft, so wird von diesem das Licht in alle Richtungen gestreut. Die gestreuten Lichtstrahlen interferieren miteinander und führen zu einer Fluktuation in der Streuintensität. Mit Hilfe einer Autokorrelationsfunktion wird die Diffusionsgeschwindigkeit unter Berücksichtigung der Korrelation zwischen der Zeit und der Streuintensität berechnet. Das Verhältnis zwischen Partikelgröße und Brown'scher Molekularbewegung wird durch die Stokes-Einstein-Beziehung beschrieben:

$$D = \frac{k_B \cdot T}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot R_h} \quad (4)$$

D : Diffusionskoeffizient;

k_B : Boltzmann-Konstante;

T : Temperatur;

η : Viskosität des Dispersionsmittels;

R_h : hydrodynamischer Radius.

Die Korrelationsfunktion hat bei monodispersen Partikeln einen exponentiellen Verlauf. Dieser Verlauf verändert sich mit zunehmender Polydispersität der Partikel. Aus der mathematischen Beschreibung der Funktion wird der Polydispersitätsindex (PDI) ermittelt, welcher die Größenverteilung der Partikel beschreibt. Die erhaltene Partikelgrößen-

verteilung kann als monodispers angenommen werden, falls der PDI kleiner als 0,3 ist.

In allen wässrigen Systemen wie Dispersionen und Suspensionen spielt das Zetapotential an der Phasengrenze fest-flüssig eine wichtige Rolle. Das Zetapotential ist keine direkt ermittelbare Größe, sondern muss über die Bestimmung der elektrophoretischen Mobilität der Partikel ermittelt werden. Durch die Ladung an der Oberfläche der Partikel wandern diese in einem angelegten Feld entsprechend ihrer Ladung zur entgegengesetzt geladenen Elektrode. Ein Strömungspotential wird dadurch messbar. Das Vorzeichen des Potentialwertes gibt die vorliegende Ladungsart wieder. Mit Hilfe der Henry-Gleichung kann das Zetapotential direkt aus der elektrophoretischen Mobilität bestimmt werden.

$$U_E = \frac{2 \cdot \varepsilon \cdot \zeta \cdot f(ka)}{3 \cdot \eta} \quad (5)$$

U_E : elektrophoretische Mobilität;

ε : Dielektrizitätskonstante;

ζ : Zetapotential;

η : Viskosität des Dispersionsmittels;

$f(ka)$: Henry-Funktion.

4.3.2 Rasterelektronenmikroskopie

Bei der Rasterelektronenmikroskopie (REM) wird die Oberflächentopographie einer Probe mit der höheren Auflösung abgebildet. Dabei werden Elektronen thermisch emittiert, gebündelt und über eine angelegte Spannung im Kilovoltbereich (5–30 kV) beschleunigt und mit Magnetspulen zu einem definierten Elektronenstrahl gebündelt. Mit Hilfe elektromagnetischer Linsen wird der Elektronenstrahl mit optimal kleinem Durchmesser auf der Probe fokussiert. Durch Wechselwirkungsprozesse der Primärelektronen mit den Atomen der Probe entstehen Sekundär- und Rückstreuelektronen, die von

entsprechenden Detektoren in elektrische Signale umgewandelt werden. Aus den gemessenen Signalen wird das Bild erstellt. Um eine Aufladung der Probe zu vermeiden, wird diese vorher mit einer Gold/Palladium-Legierung bedampft. Die erhaltene Schicht ist hierbei nur wenige nm dick und ermöglicht bessere Aufnahmen.

4.3.3 Energiedispersive Röntgenspektroskopie

Mit Hilfe der Energiedispersiven Röntgenspektroskopie (EDX) lässt sich die elementare Zusammensetzung einer Probe durch emittierte Röntgenstrahlen bestimmen. Hierzu wird das Atom durch den Elektronenstrahl zunächst angeregt. Durch die Anregung wird ein Elektron aus einer inneren Schale des Atoms herausgeschlagen. Sofort wird diese Lücke durch ein Elektron aus einer energetisch höheren Schale aufgefüllt. Dieses Elektron emittiert dabei ein charakteristisches Röntgen-Photon. Die Detektion dieses Photons lässt aufgrund seiner Energie Rückschlüsse auf das Element zu.

4.3.4 Konfokale Laser-Scanning Mikroskopie

Typischerweise werden komplexe biologische Proben mit Fluoreszenzmarkierten Molekülen angefärbt und konjugiert, um einen vollständigen Informationsgehalt zu erhalten. Die Verwendung von verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen ermöglicht die simultane Messung mehrerer Signale mit einem konfokalen Laser-Scanning Mikroskop (CLSM).

Das CLSM ist ein spezielles Lichtmikroskop, bei dem ein fokussierter Laserstrahl die Probe punktweise abtastet. Der schematische Aufbau eines CLSM ist in Abbildung 102 dargestellt. Der Laser dient als Lichtquelle mit mehreren Linien zur Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe, die in der Probe zu finden sind. Der Scanner enthält die konfokale *Pinhole*-Anordnung und einen Strahlteiler, der das Laserlicht mit der Anregungswellenlänge reflektiert und anschließend auf die Ebene der biologischen Probe fokussiert. Das Anregungslicht wird durch einen beweglichen Spiegel rasterförmig über die unter dem Mikroskop befindliche Probe bewegt. Der Fluoreszenzstrahl, das

von der Probe emittierte Licht, wird vom Objektiv gesammelt und gelangt über die Scannerspiegel wiederum auf den Strahlteiler. Das vom Strahlteiler transmittierte Licht gelangt durch die Detektionslochblende (*Pinhole*) auf einen Detektor. Das Fluoreszenzlicht, welches aus den Objektteilen außerhalb des Beleuchtungs-fokus stammt, wird vor dem Detektor ausgeblendet.

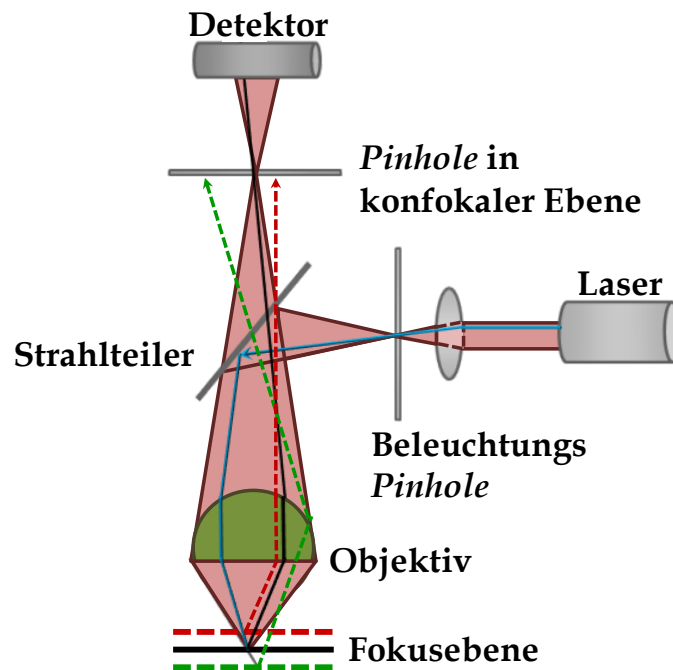


Abb. 102: Grundprinzip eines konfokalen Laser-Scanning Mikroskops.

Im Gegensatz zur konventionellen Lichtmikroskopie wird nicht die ganze Probe beleuchtet, sondern zu jedem Zeitpunkt nur ein kleiner Teil (ein Lichtfleck) davon. Diese Beleuchtung wird Schritt für Schritt über die Probe gerastert. Im Mikroskop entsteht also zu keinem Zeitpunkt ein vollständiges Bild. Die Fluoreszenzintensitäten werden folglich nacheinander an allen Orten des abzubildenden Bereiches gemessen, so dass eine anschließende Zusammensetzung des Bildes möglich ist.

4.3.5 Fluoreszenzmikroskopie

Unter Fluoreszenzspektroskopie versteht man eine optische Untersuchungsmethode, die auf dem physikalischen Effekt der Fluoreszenz beruht. Die

Methode ist besonders bei Fluoreszenzfarbstoffen von Interesse. Bei der Messung können mehrere Messprinzipien verwendet werden. Im einfachsten Fall wird das Licht einer festen Wellenlänge auf die zu untersuchende Probe gestrahlt, mit einer anderen Wellenlänge von der Probe emittiert und anschließend detektiert. Als Lichtquellen werden häufig Quecksilberdampf- und Xenonlampen verwendet. Die Selektion der Wellenlängen erfolgt mit Hilfe von Filtern (Anregungs- und Emissionsfilter).

4.3.6 Durchflusszytometrie

Unter Durchflusszytometrie (*Fluorescence Activated Cell Sorting*, FACS) versteht man eine Analyse von Einzelzellen in einer Suspension, die auf der Messung von Lichtstreuung und Fluoreszenz nach der Beleuchtung jeder Zelle basiert. Der Aufbau eines Durchflusszytometers ist in Abbildung 103 dargestellt.

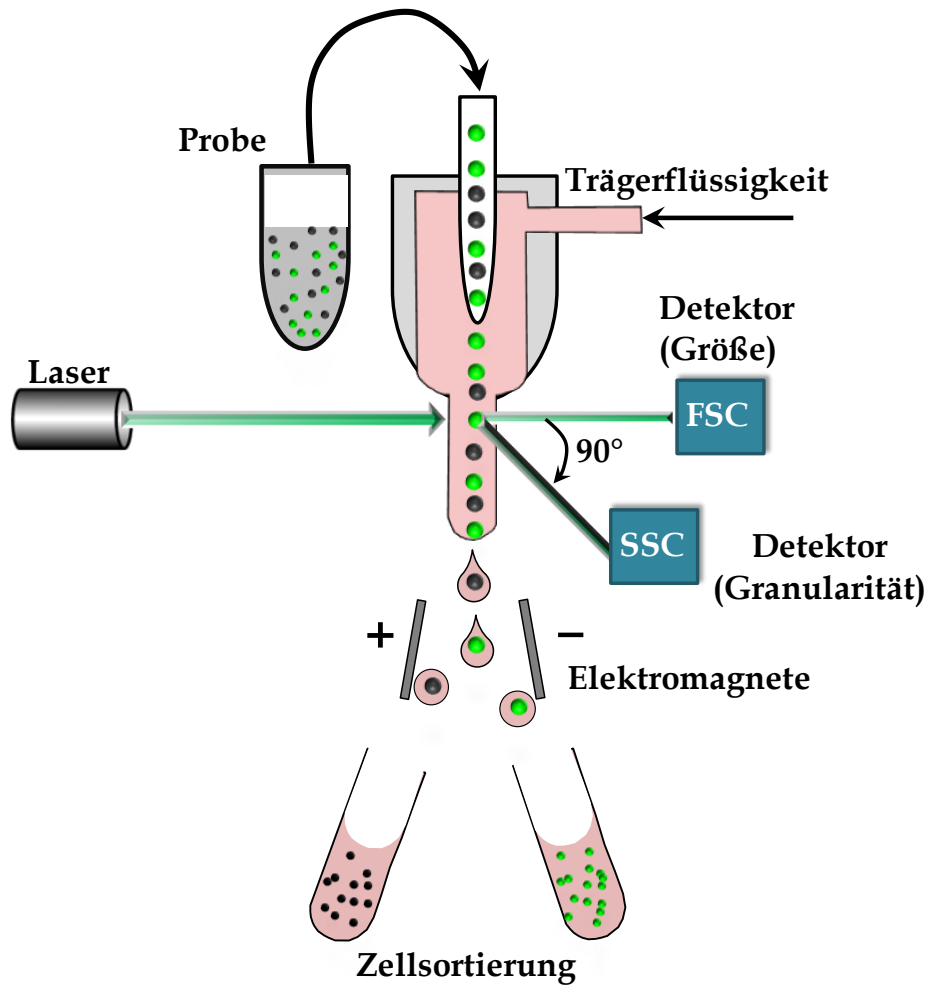


Abb. 103: Schematischer Aufbau eines Durchflusszytometers.

Der Durchflusszytometer besteht aus mehreren kombinierten Komponenten: Der Hüllflüssigkeit (Trägerflüssigkeit) zur Zellzufuhr und -Fokussierung im Messpunkt, der Lichtquelle und der Optik, sowie dem Detektorsystem. Als Lichtquelle werden einer oder mehrere Laser unterschiedlicher Wellenlänge verwendet, um damit mehrere Zelleigenschaften parallel zu erfassen. Das Messprinzip beruht auf einem optischen Signal, wenn eine Zelle den Laserstrahl trifft. Durch eine Hüllflüssigkeit werden die Zellen einzeln im Raum ausgerichtet und über eine Kapillare am Laserstrahl vorbei gespült. Das dabei entstehende Streulicht oder Fluoreszenzsignal wird von einem Detektor ausgewertet. Das Ergebnis sind quantitative Informationen über jede einzelne analysierte Zelle. Durch diese Analyse innerhalb eines sehr kurzen Zeitintervalls erhält man schnell repräsentative Information über die gesamte Zellpopulation.

4.3.7 UV-Vis-Spektroskopie

Bei der UV-Vis-Spektroskopie handelt es sich um ein experimentelles Verfahren, bei welchem die Elektronen von Atomen oder Molekülen durch elektromagnetische Strahlung des ultravioletten (200-380 nm, UV) oder sichtbaren Bereiches (380-780 nm, Vis) angeregt werden. Die Strahlung einer bestimmten Wellenlänge wird durch die zu untersuchende Probe hindurch geschickt. Ein Teil der elektromagnetischen Strahlung wird von der Probe absorbiert. Die austretende Strahlung wird von einem Detektor registriert. Die Absorption wird dann als Funktion der Wellenlänge der Strahlung aufgetragen. Für bestimmte funktionelle Gruppen (Chromophore) liegen diese Banden bei charakteristischen Wellenlängen, sodass ihre qualitative Identifikation ermöglicht wird. Die quantitativen Bestimmungen werden überwiegend mit Hilfe von Kalibriergeraden durchgeführt. Dabei kommt das Lambert-Beersche-Gesetz zur Anwendung, das bei ausreichend niedriger Konzentration c der zu untersuchende Substanz und der Verwendung von monochromatischem Licht gilt:

$$E = \lg \frac{I_0}{I} = \varepsilon \cdot c \cdot d \quad (6)$$

E : Extinktion;

I_0 : Intensität des eingestrahnten Lichts;

I : Intensität des austretenden Lichts;

ε : substanzspezifischer Extinktionskoeffizient;

c : Konzentration;

d : Küvettendicke.

4.3.8 Infrarot-Spektroskopie

Das Prinzip der Infrarot-Spektroskopie (IR) beruht auf der Anregung von Energiezuständen in Molekülen durch Strahlung im infraroten Bereich. Ein

Infrarot-Spektrum wird erhalten, wenn die Strahlung durch eine Probe geschickt und bestimmt wird. Die Energie, bei der ein Absorptionsband gemessen wird, entspricht der Schwingungsenergie einer chemischen Bindung in einem Molekül. Der Bereich mit den für die Analyse benötigten Signalen liegt in der Regel zwischen 400 und 4000 Wellenzahlen (cm^{-1}). Da solche Schwingungen für funktionelle Gruppen im Molekül spezifisch sind, lassen sich mit der IR-Spektroskopie vor allem in der Organischen Chemie bestimmte funktionelle Gruppen schnell und zuverlässig identifizieren.

4.3.9 Atomabsorptionsspektroskopie und Elementaranalyse

Die Atomabsorptionsspektroskopie (AAS) ist eine Analystechnik, mit welcher die elementare Zusammensetzung von Feststoffen und Lösungen bestimmt werden kann. Bei der AAS-Messung müssen die zu untersuchenden Atome in der Gasphase vorliegen. Die Proben werden entweder durch Erhitzung in einer Flamme oder in einem Graphitofen in die Gasphase gebracht. Dabei wird die Tatsache genutzt, dass die Elektronen eines Atoms im elektronischen Grundzustand eine für das jeweilige Element charakteristische Energie absorbieren können. Sie gelangen dadurch in einen elektronisch angeregten Zustand. Um eine Probe auf ein bestimmtes Element hin untersuchen zu können, bedarf es daher elektromagnetischer Strahlung in der gewünschten Wellenlänge. Das emittierte Licht einer geeigneten Lampe wird von der Probe teilweise absorbiert, wodurch die Intensität des Lichtes gedämpft wird. Ein Detektor misst die Lichtintensität und das Verhältnis aus eingestrahelter und gemessener Intensität ist proportional zur Konzentration des Elements. Diese Abschwächung wird gemessen und ergibt das Signal.

Die Elementaranalyse (EA) dient der quantitativen Bestimmung der Elemente Kohlenstoff, Wasserstoff und Stickstoff. Die Probe wird in einem Oxidationsreaktor unter reinem Sauerstoff bei hohen Temperaturen (800–900 °C) verbrannt. Kohlenstoff wird zu CO oder CO₂ oxidiert, Wasserstoff reagiert zu Wasser und Stickstoff zu Stickoxiden oder molekularem Stickstoff. Entstehende Verbrennungsprodukte werden mit Hilfe eines Träger-

gases über einen heißen Kupferoxidkontakt geleitet, wodurch die Stickoxide vollständig zu N_2 reduziert werden. Schließlich werden die Verbrennungsgase (CO_2 , H_2O , N_2) gaschromatographisch getrennt und quantitativ (durch Wärmeleitfähigkeitssensoren) detektiert.

4.3.10 Lyophilisation (Gefriertrocknung)

Die Gefriertrocknung oder auch Lyophilisation ist ein Verfahren zur schonenden Trocknung von hochempfindlichen Biomolekülen. Die Gefriertrocknung beruht auf der Entfernung des Wassers aus der Probe, aus dem gefrorenen Zustand heraus (Sublimation). Der Stoffübergang vom festen in den gasförmigen Zustand in Abhängigkeit von Druck und Temperatur lässt sich mit dem Phasendiagramm von Wasser erklären. Damit die Sublimation stattfinden kann, sind niedrige Drücke und Temperaturen nötig.

Das zurückbleibende getrocknete Produkt ist lager stabil und kann mit dem Ausgangsvolumen des Wassers wieder in den ursprünglichen Zustand überführt werden.

Zusammenfassung

Nanopartikuläre Wirkstoffträgersysteme besitzen ein großes Potential für therapeutische Anwendungen. In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene grundlegende Aspekte, die für das erweiterte biologische Verständnis und die Entwicklung weiterer zielgerichteter Strategien zum Einsatz von Nanopartikeln in der Biomedizin notwendig sind, näher untersucht.

In dieser Arbeit wurde eine neuartige Syntheseroute zur Herstellung biokompatibler Silica-modifizierter Calciumphosphat-Nanopartikel entwickelt. Durch eine weitere Silanisierung wurde die Partikeloberfläche mit Amino- oder Thiolgruppen kovalent funktionalisiert. Dies ermöglicht die weitere kovalente Konjugation mit den Molekülen, z.B. mit Farbstoffen oder Antikörpern. Weiterhin konnte in diesem nanopartikulären Aufbau eine zusätzliche Beladung mit Biomolekülen oder eine Markierung mit NIR-Farbstoffen aufgebracht werden.

Die Einflüsse der Oberflächenchemie der nanopartikulären Systeme auf deren zelluläre Aufnahmewege wurden untersucht. Die Experimente zur zellulären Aufnahme wurden mit negativ und positiv geladenen Calciumphosphat-Nanopartikel an HeLa-Zellen durchgeführt. Der Hauptaufnahmeweg der Nanopartikel in die Zelle ist die Makropinozytose. Dies konnte durch Zellaufnahmestudien mit Calciumphosphat-Nanopartikeln bestätigt werden. Es konnte ein Energie-abhängiger Aufnahmemechanismus gezeigt werden. Im Allgemeinen wurden die Nanopartikel schnell von frühen Endosomen zu späten Endosomen und schließlich zu Lysosomen, in denen ein Abbau stattfindet, weitergeleitet.

Um die *in vivo*-Verteilung der funktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikel zu untersuchen, wurde ein Maestro™ *in vivo* Fluoreszenz-Imaging System verwendet, das eine Verfolgung der NIR Farbstoff-markierten Nanopartikeln im Maus ermöglicht. Es zeigte sich, dass ein Teil der markierten Nanopartikel über dem EPR-Effekt im Tumor akkumuliert wurden. Die Ausscheidung der Partikel erfolgte im Wesentlichen über die Mechanismen

des Lebertransports durch den Darm. Die Beladung der NIR-markierten Nanopartikeln mit einem Photosensibilisator und die Konjugation mit einem dirigierenden Peptid ermöglichten den Einsatz in Photodynamische Therapie. Diese multifunktionellen Nanopartikel zeigten eine effektive therapeutische Wirksamkeit und konnten eine Apoptose und Zerstörung der Tumorgefäßbildung bewirken.

In einer weiteren Experimentreihe wurden EGFP-DNA-beladene funktionalisierte Nanopartikel hinsichtlich ihrer Eignung als Wirkstoffträgersysteme an mehreren Zelllinien untersucht. Ein Ausgleich zwischen einer guten Transfektionseffizienz und der Zellvitalität konnte für bestimmte Konzentrationen der Calciumphosphat-Nanopartikel gezeigt werden. Die erfolgreiche zelluläre Aufnahme der CpG-beladenen Nanopartikel konnte mittels CLSM-Untersuchungen bestätigt werden.

Im Weiteren wurden die Silica-modifizierten Nanopartikel mit einem Flagellin-Adjuvant beladen, um die immunstimulierende Wirkung auf das angeborene Immunsystem zu untersuchen. Die Flagellin-beladenen Nanopartikel konnten die extrazellulären (TLR5) und intrazellulären (NLRC4) Signalwege aktivieren und die Freisetzung von IL-1 β und IL-6 *in vitro* und IL-8 *in vivo* induzieren.

Der Fokus dieser Arbeit lag auf der definierten Synthese der Antikörperkonjugierten Calciumphosphat-Nanopartikel zur spezifischen Adressierung von Zellen. Als zu konjugierende, biologisch aktive Komponenten wurden der anti-CD11c-Antikörper für die gezielte Adressierung der dendritischen Zellen und der anti-IgG-Kontrollantikörper ausgewählt. Die Nanopartikel konnten mit dem heterobifunktionellem Crosslinker Sulfo-SMCC mit den Antikörpern gekoppelt werden. Es konnte durch Konjugation des spezifischen Antikörpers eine selektive Partikelaufnahme mit dendritischen Zellen innerhalb der Milzzellkultur *in vitro* und *in vivo* erzielt werden.

Des Weiteren wurde die Antigen-spezifische Adressierung der funktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikel in den naiven B-Zellen untersucht. Die Partikel wurden mit einem spezifischen HEL-Protein (*hen egg lysozyme*) und BSA (*bovine serum albumin*) als Modellprotein konjugiert. In den durch-

geführten Zellexperimenten konnten die Antigen-spezifische Adressierung und primäre Aktivierung der naiven B-Zellen demonstriert werden.

Außerdem wurden die miRNA-beladenen dreischaligen Calciumphosphat-Nanopartikel zur Stummschaltung von Survivin in Neuroblastom-Xenografts getestet. Die erhaltenen Ergebnisse zeigten, dass die Partikel die erneute Expression von miR-542-3p *in vivo* bewirken konnten. Dadurch konnte die verringerte Proliferation und erhöhte Apoptose in Heterotransplantaten gezeigt werden.

Zusammenfassend stellen die entwickelten Calciumphosphat-Nanopartikel ein universelles Trägersystem dar, welches für die Anwendung im biologischen System sowohl *in vitro* als auch *in vivo* gut geeignet ist.

Summary

Nanoparticulate drug delivery systems have a great potential for therapeutic applications. In present work different general aspects for advanced biological understanding and development of more targeted strategies for the use of nanoparticles in biomedicine were investigated.

A novel synthetic route for the preparation of biocompatible silica-modified calcium phosphate nanoparticles was developed. By further silanization using silica precursors, the particle surface was functionalized with amino or thiol groups. This allows the covalent conjugation with molecules like dyes or antibodies. Furthermore, an additional loading of the biomolecules or a labeling with NIR dyes was applied in this nanoparticulate structure.

The influence of the surface chemistry of the nanoparticulate systems on their cellular uptake pathways were examined. The cellular uptake experiments were performed with negatively and positively charged calcium phosphate nanoparticles on HeLa cells. The main uptake mechanism of the nanoparticles into the cells was macropinocytosis. It was possible to show an energy-dependent uptake mechanism. In general, the nanoparticles were quickly transferred from early endosomes to late endosomes and finally to lysosomes where degradation occurs.

In order to study the *in vivo* distribution of functionalized calcium phosphate nanoparticles, a Maestro™ *in vivo* fluorescence imaging system was used. This allowed the tracking of the NIR dye-labeled nanoparticles in mice. One part of the labeled nanoparticles were accumulated by the EPR effect in the tumor. The elimination of the particles from the mouse occurred by hepatic transport through the stomach. The loading of the NIR dye-labeled nanoparticles with a photosensitizer and further conjugation with targeted peptide allowed their application for photodynamic therapy. These multifunctional calcium phosphate nanoparticles showed a positive therapeutic effect and induced apoptosis of the tumor as well as the destruction of tumor vascularization.

In another set of experiments, EGFP-DNA-loaded functionalized nanoparticles were investigated for their suitability as drug delivery systems in

various cell lines. A balance between a sufficient transfection efficiency and the cell viability could be achieved for a given concentration of calcium phosphate nanoparticles. The successful cellular uptake of CpG-loaded nanoparticles was also confirmed by CLSM studies.

Furthermore, the silica-modified nanoparticles were loaded with a flagellin-adjuvant in order to examine the immune-stimulating effect on the innate immune system. The flagellin-loaded nanoparticles were able to activate extracellular (TLR5) and intracellular (NLRC4) signaling pathways and led to the production of IL-1 β and IL-6 *in vitro* and IL-8 *in vivo*.

The focus of this work was the synthesis of antibody-conjugated calcium phosphate nanoparticles for specific addressing of cells. For the conjugation reaction, the anti-CD11c antibody for specific addressing of dendritic cells and the anti-IgG control antibody were selected. The nanoparticles were conjugated using the heterobifunctional crosslinker sulfo-SMCC. The selective particle uptake in dendritic cells in *in vitro* and *in vivo* studies could be shown after incubation the spleen cells with anti-CD11c antibody-conjugated calcium phosphate nanoparticles.

Furthermore, the antigen-specific targeting of the functionalized nanoparticles in naive B-cells was examined. The particles were conjugated with a specific HEL (hen egg lysozyme) protein and BSA (bovine serum albumin) as model protein. An antigen-specific addressing and primary activation of naive B-cells were demonstrated.

In addition, miRNA-loaded triple-shell calcium phosphate nanoparticles were used for the downregulation of survivin in neuroblastom-xenografts. The obtained results showed that the particles were able to induce the re-expression of miR-542-3p *in vivo*. Thereby a decreased proliferation and an increased apoptosis in xenografts were caused.

In summary, the developed calcium phosphate nanoparticles are universal carrier systems which are well suited for use in the biological system both *in vitro* and *in vivo*.

Literaturverzeichnis

1. T. L. Doane and C. Burda, *Chem. Soc. Rev.*, 2012, **41**, 2885-2911.
2. W. J. Stark, *Angew. Chem.*, 2011, **50**, 1242-1258.
3. B. Y. S. Kim, J. T. Rutka and W. C. W. Chan, *New England J. Med.*, 2010, **363**, 2434-2443.
4. K. Riehemann, S. W. Schneider, T. A. Luger, B. Godin, M. Ferrari and H. Fuchs, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2009, **48**, 872-897.
5. T. Lammers, F. Kiessling, W. E. Hennink and G. Storm, *J. Contr. Rel.*, 2012, **161**, 175-187.
6. A. E. Nel, L. Madler, D. Velegol, T. Xia, E. M. V. Hoek, P. Somasundaran, F. Klaessig, V. Castranova and M. Thompson, *Nature Mater.*, 2009, **8**, 543-557.
7. S. Mitragotri and J. Lahann, *Nature Mater.*, 2009, **8**, 15-23.
8. V. Sokolova, T. Knuschke, J. Buer, A. M. Westendorf and M. Epple, *Acta Biomater.*, 2011, **7**, 4029-4036.
9. S. Nangia and R. Sureshkumar, *Langmuir*, 2012, **28**, 17666-17671.
10. Y. M. Lvov, P. Pattekari, X. Zhang and V. Torchilin, *Langmuir*, 2011, **27**, 1212-1217.
11. D. R. Khan, *J. Cancer Sci. Ther.*, 2010, **2**, 58-62.
12. N. Desai, *AAPS J.*, 2012, **14**, 282-295.
13. V. Sokolova and M. Epple, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2008, **47**, 1382-1395.
14. T. Knuschke, V. Sokolova, O. Rotan, M. Wadwa, M. Tenbusch, W. Hansen, P. Staeheli, M. Epple, J. Buer and A. M. Westendorf, *J. Immunol.*, 2013, **190**, 6221-6229.
15. S. K. Balasubramanian, L. Liming Yang, L. Y. L. Yung, C. N. Ong, W. Y. Ong and L. E. Yu, *Biomaterials*, 2010, **31**, 9023-9030.
16. V. J. Mohanraj and Y. Chen, *Trop. J. Pharm. Res.*, 2006, **5**, 561-573.

17. S. M. Moghimi, A. C. Hunter and J. C. Murray, *Pharmacol. Rev.*, 2001, **53**, 283-318.
18. M. Gaumet, A. Vargas, R. Gurny and F. Delie, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2008, **69**, 1-9.
19. D. W. Grainger and D. G. Castner, *Adv. Mater.*, 2008, **20**, 867-877.
20. A. Hahn, J. Fuhrlott, A. Loos and S. Barcikowski, *J. Nanopart. Res.*, 2012, **14**, 686.
21. C. He, Y. Hu, L. Yin, C. Tang and C. Yin, *Biomaterials*, 2010, **31**, 3657-3666.
22. O. C. Farokhzad, J. Cheng, B. A. Teply, I. Sherifi, S. Jon, P. W. Kantoff, J. P. Richie and R. Langer, *PNAS*, 2006, **103**, 6315-6320.
23. S. R. Saptarshi, A. Duschl and A. L. Lopata, *J. Nanobiotechnol.*, 2013, **11**, 1-12.
24. A. Salvati, A. S. Pitek, M. P. Monopoli, K. Prapainop, F. B. Bombelli, D. R. Hristov, P. M. Kelly, C. Åberg, E. Mahon and K. A. Dawson, *Nature Nanotech.*, 2013, **8**, 137-143.
25. A. Lesniak, A. Salvati, M. J. Santos-Martinez, M. W. Radomski, K. A. Dawson and C. Åberg, *J. Am. Chem. Soc.*, 2013, **135**, 1438-1444.
26. M. P. Monopoli, C. Åberg, A. Salvati and K. A. Dawson, *Nature Nanotech.*, 2012, **7**, 779-786.
27. G. Lagaly, O. Schulz and R. Zimehl, *Dispersionen und Emulsionen*, Steinkopff Verlag, Darmstadt, 1997.
28. H.-D. Dörfler, *Grenzflächen und kolloid-disperse Systeme: Physik und Chemie*, Springer, Berlin, 2002.
29. S. V. Dorozhkin and M. Epple, *Angew. Chem.*, 2002, **114**, 3260-3277.
30. M. Epple, *Biomaterialien und Biomineralisation. Eine Einführung für Naturwissenschaftler, Mediziner und Ingenieure*, Teubner, Wiesbaden, 2003.
31. M. P. Ferraz, F. J. Monteiro and C. M. Manuel, *J. Appl. Biomater. Biomech.*, 2004, **2**, 74-80.

32. L. M. Rodriguez-Lorenzo and M. Vallet-Regi, *Chem. Mater.*, 2000, **12**, 2460-2465.
33. H. Urch, M. Vallet-Regi, L. Ruiz, J. M. Gonzalez-Calbet and M. Epple, *J. Mater. Chem.*, 2009, **19**, 2166-2171.
34. F. L. Graham and A. J. van der Eb, *Virology*, 1973, **52**, 456-467.
35. I. Roy, S. Mitra, A. Maitra and S. Mozumdar, *Int. J. Pharm.*, 2003, **250**, 25-33.
36. A. Maitra, *Expert Rev. Mol. Diagn.*, 2005, **5**, 893-905.
37. Y. Kakizawa and K. Kataoka, *Langmuir*, 2002, **18**, 4539-4543.
38. J. Schwiertz, A. Wiehe, S. Gräfe, B. Gitter and M. Epple, *Biomaterials*, 2009, **30**, 3324-3331.
39. S. Padilla Mondejar, A. Kovtun and M. Epple, *J. Mater. Chem.*, 2007, **17**, 4153-4159.
40. T. T. Morgan, H. S. Muddana, E. I. Altinoglu, S. M. Rouse, A. Tabakovic, T. Tabouillot, T. J. Russin, S. S. Shanmugavelandy, P. J. Butler, P. C. Eklund, J. K. Yun, M. Kester and J. H. Adair, *Nano Lett.*, 2008, **8**, 4108-4115.
41. E. I. Altinoğlu, T. J. Russin, J. M. Kaiser, B. M. Barth, P. C. Eklund, M. Kester and J. H. Adair, *ACS Nano*, 2008, **2**, 2075-2084.
42. J. Schwiertz, W. Meyer-Zaika, L. Ruiz-Gonzalez, J. M. Gonzales-Calbet, M. Vallet-Regi and M. Epple, *J. Mater. Chem.*, 2008, **18**, 3831-3834.
43. V. V. Sokolova, I. Radtke, R. Heumann and M. Epple, *Biomaterials*, 2006, **27**, 3147-3153.
44. V. Sokolova, A. Kovtun, O. Prymak, W. Meyer-Zaika, E. A. Kubareva, E. A. Romanova, T. S. Oretskaya, R. Heumann and M. Epple, *J. Mater. Chem.*, 2007, **17**, 721-727.
45. V. Sokolova, T. Knuschke, A. Kovtun, J. Buer, M. Epple and A. M. Westendorf, *Biomaterials*, 2010, **31**, 5627-5633.

46. P. Yang, A. Zhang, H. Sun, F. Liu, Q. Jiang and X. Cheng, *J. Colloid Interface Sci.*, 2010, **345**, 222-227.
47. A. Wolcott, D. Gerion, M. Visconte, J. Sun, A. Schwartzberg, S. Chen and Z. J. Zhang, *J. Phys. Chem.*, 2006, **110**, 5779-5789.
48. B. M. Barth, E. I. Altinoğlu, S. S. Shanmugavelandy, J. M. Kaiser, D. Crespo-Gonzalez, N. A. DiVittore, C. McGovern, G. T. M., N. R. Keasey, J. H. Adair, T. P. Loughran, D. F. Claxton and M. Kester, *ACS Nano*, 2011, **5**, 5325-5337.
49. A. Webster, S. J. Compton and J. W. Aylott, *Analyst*, 2005, **130**, 163-170.
50. W. Stöber, A. Fink and E. Bohn, *J. Colloid Interface Sci.*, 1968, **26**, 62-69.
51. M. Neumeier, L. A. Hails, S. A. Davis, S. Mann and M. Epple, *J. Mater. Chem.*, 2011, **21**, 1250-1254.
52. L. Borum and O. C. Wilson, *Biomaterials*, 2003, **24**, 3681-3688.
53. C. Graf, Q. Gao, I. Schütz, C. N. Noufele, W. Ruan, U. Posselt, E. Korotianskiy, D. Nordmeyer, F. Rancan, S. Hadam, A. Vogt, J. Lademann, V. Haucke and E. Rühl, *Langmuir*, 2012, **28**, 7598-7613.
54. A. van Blaaderen and A. Vrij, *Langmuir*, 1992, **8**, 2921-2931.
55. R. Shen, P. H. C. Camargo, Y. Xia and H. Yang, *Langmuir*, 2008, **24**, 11189-11195.
56. M. Jäger, S. Schubert, S. Ochrimenko, D. Fischer and U. S. Schubert, *Chem. Soc. Rev.*, 2012, **41**, 4755-4767.
57. M. Neumeier, *Dissertation "Calciumphosphat-Nanopartikel als fluoreszierendes Material und zur elektrophoretischen Beschichtung nanostrukturierter Oberflächen"*, Universität Duisburg-Essen, Essen, 2011.
58. M. Jevtic, M. Mitric, S. Skapin, B. Jancar, N. Ignjatovic and D. Uskokovic, *Cryst. Growth Des.*, 2008, **8**, 2217-2222.

-
59. T. Yang, A. Hussain, S. Bai, I. A. Khalil, H. Harashima and F. Ahsan, *J. Contr. Rel.*, 2006, **27**, 289-297.
60. M. Iijima and H. Kamiya, *KONA Powder Part. J.*, 2009, **27**, 119-129.
61. N. Gartmann and D. Brühwiler, *Angew. Chem.*, 2009, **121**, 6472-6475.
62. M. Yamaura, R. L. Camilo, L. C. Sampaio, M. A. Macedo, M. Nakamura and H. E. Toma, *J. Magn. Magn. Mater.*, 2004, **279**, 210-217.
63. T. Y. Cheang, B. Tang, A. W. Xu, G. Q. Chang, Z. J. Hu, W. L. He, Z. H. Xing, J. B. Xu, M. Wang and S. M. Wang, *Int. J. Nanomed.*, 2012, **7**, 1061-1067.
64. F. Qui, Y. Jiang, Y. Zhou and J. Liu, *Silicon Chem.*, 2006, **3**, 65-73.
65. Y. M. Thasneem, S. Sajeesh and C. P. Sharma, *J. Biomed. Mater. Res.*, **99**, 607-617.
66. K. Burns, P. Sengupta, T. Zedayko, B. Baird and U. Wiesner, *Small*, 2006, **6**, 723-726.
67. N. Chekina, D. Horak, P. Jendelova, M. Trchova, M. J. Benes, M. Hruby, V. Herynek, K. Turnovcova and E. Sykova, *J. Mater. Chem.*, 2011, **21**, 7630-7639.
68. N. Zhang, E. Ding, X. Feng, Y. Xu and H. Cai, *Coll. Surf. B: Biointerfaces*, 2012, **89**, 133-138.
69. V. Sokolova, O. Rotan, J. Klesing, P. Nalbant, J. Buer, T. Knuschke, W. A. M. and M. Epple, *J. Nanopart. Res.*, 2012, **14**, 1-10.
70. S. Hornig, C. Biskup, A. Gräfe, J. Wotschaldo, T. Liebert, G. J. Mohr and T. Heinze, *Soft Matter*, 2008, **4**, 1169-1172.
71. J. Liu, Z. Diwu and W. Y. Leung, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2001, **11**, 2903-2905.
72. C. S. Owen, P. Carango, S. Grammer, S. Baobyock and D. B. Leeper, *J. Fluoresc.*, 1992, **2**, 75-80.
73. J. Vecer, A. Holoubek and K. Sigler, *Photochem. Photobiol.*, 2001, **74**, 8-13.

74. O. Kreft, A. M. Javier, G. B. Sukhorukov and W. J. Parak, *J. Mater. Chem.*, 2007, **17**, 4471-4476.
75. G. J. Doherty and H. T. McMahon, *Ann. Rev. Biochem.*, 2009, **78**, 857-902.
76. L. L. Mercato, A. Z. Abbasi and W. J. Parak, *Small*, 2011, **7**, 351-363.
77. H. Guo, H. Qian, S. Sun, D. Sun, H. Yin, X. Cai, Z. Liu, J. Wu, T. Jiang and X. Liu, *Chem. Cent. J.*, 2011, **5**, 1-10.
78. J. Dausend, A. Musyanovych, M. Dass, P. Walther, H. Schrezenmeier, K. Landfester and V. Mailänder, *Macromol. Biosci.*, 2008, **8**, 1135-1143.
79. L. P. Fernando, P. K. Kandel, J. Yu, J. McNeill, P. C. Ackroyd and K. A. Christensen, *Biomacromolecules*, 2010, **11**, 2675-2682.
80. M. Barrachina, T. Maes, C. Buesa and I. Ferrer, *Neuropath. Appl. Neuro.*, 2006, **32**, 505-516.
81. M. Motskin, K. H. Müller, C. Genoud, A. G. Monteith and J. N. Skepper, *Biomaterials*, 2011, **32**, 9470-9482.
82. A. E. Ewence, M. Bootman, H. L. Roderick, J. N. Skepper, G. McCarthy, M. Epple, M. Neumann, C. M. Shanahan and D. Proudfoot, *Circ. Res.*, 2008, **103**, 28-32.
83. M. Motskin, D. M. Wright, K. Muller, N. Kyle, T. G. Gard, A. E. Porter and J. N. Skepper, *Biomaterials*, 2009, **30**, 3307-3317.
84. S. Neumann, A. Kovtun, I. D. Dietzel, M. Epple and R. Heumann, *Biomaterials*, 2009, **30**, 6794-6802.
85. L. Hu, Z. Mao and C. Gao, *J. Mater. Chem.*, 2009, **19**, 3108-3115.
86. G. Sahay, D. Y. Alakhova and A. V. Kabanov, *J. Contr. Rel.*, 2010, **145**, 182-195.
87. S. D. Conner and S. L. Schmid, *Nature*, 2003, **422**, 37-44.
88. K. T. Thurn, E. M. B. Brown, A. Wu, S. Vogt, B. Lai, J. Maser, T. Paunesku and G. E. Woloschak, *Nanoscale Res. Lett.*, 2007, **2**, 430-441.

89. T.-G. Iversen, T. Skotland and K. Sandvig, *Nano Today*, 2011, **6**, 176-185.
90. T. dos Santos, J. Varela, I. Lynch, A. Salvati and K. A. Dawson, *PLoS ONE*, 2011, **6**, 24438-24448.
91. S. Luo, E. Zhang, Y. Su, T. Cheng and C. Shi, *Biomaterials*, 2011, **32**, 7127-7138.
92. S. L. Gibbs, *Quant. Imaging Med. Surg.*, 2012, **2**, 177-187.
93. N. Ramanujam, *Neoplasia*, 2000, **2**, 89-117.
94. J. Rao, A. Dragulescu-Andrasi and H. Yao, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2007, **18**, 17-25.
95. K. Natte, T. Behnke, G. Orts-Gil, C. Würth, J. F. Friedrich, W. Österle and U. Resch-Genger, *J. Nanopart. Res.*, 2012, **14**, 680-690.
96. N. Bendsoe, L. Persson, A. Johansson, J. Axelsson, J. Svensson, S. Gräfe, T. Trebst, S. Andersson-Engels, S. Svanberg and K. Svanberg, *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.*, 2007, **26**, 117-126.
97. Q. Liu, R. Li, Z. Zhu, X. Qian, W. Guan, L. Yu, M. Yang, X. Jiang and B. Liu, *Int. J. Pharm.*, 2012, **430**, 350-358.
98. J. Wang, K. Yao, C. Wang, C. Tang and X. Jiang, *J. Mater. Chem. B*, 2013, **1**, 2324-2332.
99. B. M. Barth, R. Sharma, E. I. Altinoğlu, T. T. Morgan, S. S. Shanmugavelandy, J. M. Kaiser, C. McGovern, G. L. Matters, J. P. Smith, M. Kester and J. H. Adair, *ACS Nano*, 2010, **4**, 1279-1287.
100. E. I. Antinoğlu, T. J. Russin, J. M. Kaiser, B. M. Barth, P. C. Eklund, M. Kester and J. H. Adair, *ACS Nano*, 2008, **2**, 2075-2084.
101. E. I. Altinoğlu, *Dissertation "Indocyanine green-encapsulating calcium phosphosilicate nanoparticles: bifunctional theranostic vectors for near infrared diagnostic imaging and photodynamic therapy"*, The Pennsylvania State University, Pennsylvania, 2010.

102. J. Pauli, T. Vag, R. Haag, M. Spieles, M. Wenzel, W. A. Kaiser, A. Kaiser, U. Resch-Genger and I. Hilger, *Eur. J. Med. Chem.*, 2009, **44**, 3496-3503.
103. C. Busch, T. Schröter, M. Grabolle, M. Wenzel, H. Kempe, W. A. Kaiser, U. Resch-Genger and I. Hilger, *J. Nucl. Med.*, 2012, **53**, 1-9.
104. R. Kumar, I. Roy, T. Y. Ohulchanskyy, L. A. Vathy, E. J. Bergey, M. S. Sajjad and P. N. Prasad, *ACS Nano*, 2010, **23**, 699-708.
105. D. Kozlova, S. Chernousova, T. Knuschke, J. Buer, A. M. Westendorf and M. Epple, *J. Mater. Chem.*, 2012, **22**, 396-404.
106. A. Shalviri, P. Cai, A. M. Rauth, J. T. Henderson and X. Y. Wu, *Drug Deliv. Transl. Res.*, 2012, **2**, 437-453.
107. K. H. Min, H. J. Lee, K. Kim, I. C. Kwon, S. Y. Jeong and S. C. Lee, *Biomaterials*, 2012, **33**, 5788-5797.
108. X. Cheng and L. Kuhn, *Int. J. Nanomed.*, 2007, **2**, 667-674.
109. J. Shen, Q. He, Y. Gao, J. Shi and Y. Li, *Nanoscale*, 2011, **3**, 4314-4322.
110. B. M. Shi, K. Ho, A. Keating and M. S. Shoichet, *Adv. Funct. Mater.*, 2009, **19**, 1-9.
111. D. Bechet, P. Couleaud, C. Frochot, M. L. Viriot, F. Guillemin and M. Barberi-Heyob, *Trends Biotechnol.*, 2008, **26**, 612-621.
112. J. Klesing, A. Wiehe, B. Gitter, S. Gräfe and M. Epple, *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 2010, **21**, 887-892.
113. R. Ideta, F. Tasaka, W. D. Jang, N. Nishiyama, G. D. Zhang, A. Harada, Y. Yanagi, Y. Tamaki, T. Aida and K. Kataoka, *Nano Lett.*, 2005, **5**, 2426-2431.
114. L. Smith, Z. Kuncic, K. K. Ostrikov and S. Kumar, *J. Nanomater.*, 2012, **2012**, 1-7.
115. M. C. DeRosa and R. J. Crutchley, *Coord. Chem. Rev.*, 2002, **233-234**, 351-371.

116. A. Juarranz, P. Jaén, F. Sanz-Rodriguez, J. Cuevas and S. González, *Clin. Transl. Oncol.*, 2008, **10**, 148-154.
117. Y. Zhang and J. F. Lovell, *Theranostics*, 2012, **2**, 905-915.
118. C. Rangger, A. Helbok, J. Sosabowski, C. Kremser, G. Koehler, R. Prassl, F. Andreae, I. J. Virgolini, E. von Guggenberg and C. Decristoforo, *Int. J. Nanomed.*, 2013, **8**, 4659-4671.
119. G. J. Strijkers, E. Kluza, G. A. F. Van Tilborg, D. W. van der Schaft, A. W. Griffioen, W. J. M. Mulder and K. Nicolay, *Angiogenesis*, 2010, **13**, 161-173.
120. K. Haedicke, S. Gräfe, F. Lehmann and I. Hilger, *Biomaterials*, 2013, **34**, 10075-10083.
121. Y. Manoharan, Q. Ji, T. Yamazaki, S. Chinnathambi, S. Chen, S. Ganesan, J. P. JHill, K. Ariga and N. Hanagata, *Int. J. Nanomed.*, 2012, **7**, 3625-3635.
122. S. Bauer, C. J. Kirschning, H. Häcker, V. Redecke, S. Hausmann, S. Akira, H. Wagner and G. B. Lipford, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 2001, **98**, 9237-9242.
123. A. Kovtun, R. Heumann and M. Epple, *Bio-Med. Mater. Eng.*, 2009, **19**, 241-247.
124. M. Epple, K. Ganesan, R. Heumann, J. Klesing, A. Kovtun, S. Neumann and V. Sokolova, *J. Mater. Chem.*, 2010, **20**, 18-23.
125. X. Cao, W. Deng, Y. Wei, W. Su, Y. Yang, Y. Wei, J. Yu and X. Xu, *Int. J. Nanomed.*, 2011, **6**, 3335-3349.
126. G.-J. Wu, L.-Z. Zhou, K.-W. Wang, F. Chen, Y. Sun, Y.-R. Duan, Y.-J. Zhu and H.-C. Gu, *J. Coll. Interface Sci.*, 2010, **345**, 427-432.
127. S. Bisht, G. Bhakta, S. Mitra and A. Maitra, *Int. J. Pharm.*, 2005, **288**, 157-168.
128. T. Liu, A. Tang, G. Y. Zhang, Y. X. Chen, J. Y. Zhang, S. S. Peng and Z. M. Cai, *Cancer Biother. Radiopharm.*, 2005, **20**, 141-149.

129. Y. Liu, T. Wang, F. He, Q. Liu, D. Zhang, S. Xiang, S. Su and J. Zhang, *Int. J. Nanomed.*, 2011, **6**, 721-727.
130. D. Olton, J. Li, M. E. Wilson, T. Rogers, J. Close, L. Huang, N. P. Kumta and C. Sfeir, *Biomaterials*, 2007, **28**, 1267-1279.
131. Y. Kakizawa, K. Miyata, S. Furukawa and K. Kataoka, *Adv. Mater.*, 2004, **16**, 699-702.
132. E. H. Chowdhury, M. Nagaoka, K. Ogiwara, F. T. Zohra, K. Kutsuzawa, S. Tada, C. Kitamura and T. Akaike, *Biochem.*, 2005, **44**, 12273-12278.
133. V. Sokolova, S. Neumann, A. Kovtun, S. Chernousova, R. Heumann and M. Epple, *J. Mater. Sci.*, 2010, **45**, 4952-4957.
134. T. Welzel, W. Meyer-Zaika and M. Epple, *Chem. Commun.*, 2004, 1204-1205.
135. T. Welzel, I. Radtke, W. Meyer-Zaika, R. Heumann and M. Epple, *J. Mater. Chem.*, 2004, **14**, 2213-2217.
136. C. Pautke, M. Schieker, T. Tischer, A. Kolk, P. Neth, W. Mutschler and S. Milz, *Anticancer Res.*, 2004, **24**, 3743-3748.
137. A. M. Harandi, D. Medaglini and R. J. Shattock, *Vaccine*, 2010, **28**, 2363-2366.
138. R. L. Coffman, A. Sher and R. A. Seder, *Immunity*, 2010, **33**, 492-503.
139. M. L. Mbow, E. De Gregorio, N. M. Valiante and R. Rappuoli, *Curr. Opin. Immunol.*, 2010, **22**, 411-416.
140. Z.-S. Wen, Y.-L. Xu, X.-T. Zou and Z.-R. Xu, *Mar. Drugs*, 2011, **9**, 1038-1055.
141. C. Keijzer, B. slütter, R. van der Zee, W. Jiskoot, W. van Eden and F. Broere, *PLoS ONE*, 2011, **6**, e26684.
142. E. A. Miao, E. Andrsen-Nissen, S. E. Warren and A. Aderem, *Semin. Immunopathol.*, 2007, **29**, 275-288.
143. S. L. Demento, A. L. Siefert, A. Bandyopadhyay, F. A. Sharp and T. M. Fahmy, *Trends Biotechnol.*, 2011, **29**, 294-306.

144. C. A. Janeway and R. Medzhitov, *Annu. Rev. Immunol.*, 2002, **20**, 197-216.
145. Y. Krishnamachari and A. K. Salem, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2009, **61**, 205-217.
146. R. M. Epand and H. J. Vogel, *Biochim. Biophys. Acta*, 1999, **1462**, 11-28.
147. D. M. Klinman, S. Klaschik, T. Sato and D. Tross, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2009, **61**, 248-255.
148. A. N. Honko and S. B. Mizel, *Immunol. Res.*, 2005, **33**, 83-101.
149. S. B. Mizel and J. T. Bates, *J. Immunol.*, 2010, **185**, 5677-5682.
150. F. Liu, J. Yang, Y. Zhang, D. Zhou, Y. Chen, W. Gai, W. Shi, Q. Li, P. Tien and H. Yan, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2010, **392**, 582-587.
151. L. Franchi, N. Kamada, Y. Nakamura, A. Burberry, P. Kuffa, S. Suzuki, M. H. Shaw, Y. G. Kim and G. Núñez, *Nat. Immunol.*, 2012, **13**, 449-456.
152. M. Vijay-Kumar, F. A. Carvalho, J. D. Aitken, N. H. Ffadara and A. T. Gewirtz, *Eur. J. Immunol.*, 2010, **40**, 3528-3534.
153. Y. Sun, W. Shi, J. Y. Yang, D. H. Zhou, Y. Q. Chen, Y. Zhang, Y. Yang, B. X. He, M. H. Zhong, Y. M. Li, Y. Cao, Y. Xiao, W. Li, J. Yu, Y. H. Li, M. W. Fan and H. M. Yan, *J. Dent. Res.*, 2012, **91**, 941-947.
154. W. Shi, Y. H. Li, F. Liu, J. Y. Yang, D. H. Zhou, Y. Q. Chen, Y. Zhang, Y. Yang, B. X. He, C. Han, M. W. Fan and H. M. Yan, *J. Dent. Res.*, 2012, **91**, 249-254.
155. J. Yang, M. Zhong, Y. Zhang, E. Zhang, Y. Sun, Y. Cao, Y. Li, D. Zhou, B. He, Y. Chen, Y. Yang, J. Yu and H. Yan, *Hum. Vaccin. Immunother.*, 2013, **9**, 1084-1092.
156. J. Chu, L. M. Thomas, S. C. Watkins, L. Franchi, G. Nunez and R. D. Salter, *J. Leukoc. Biol.*, 2009, **86**, 1227-1238.

157. E. Frisdal, P. Lesnik, M. Olivier, P. Robillard, M. J. Chapman, T. Huby, M. Guerin and W. Le Goff, *J. Biol. Chem.*, 2011, **286**, 30926-30936.
158. H. Yan, M. E. Lamm, E. Björling and Y. T. Huang, *J. Virol.*, 2002, **76**, 10972-10979.
159. S. E. Blutt, A. D. Miller, S. L. Salmon, D. W. Metzger and M. E. Conner, *Mucosal Immunol.*, 2012, **5**, 712-719.
160. M. Arruebo, M. Valladares and A. Gonzalez-Fernandez, *J. Nanomater.*, 2009, **2009**, 1-24.
161. V. K. Khanna, *ISRN Pharmacol.*, 2012, **2012**, 9.
162. M. D. Blanco, C. Teijon, R. M. Olmo and J. M. Teijon, *Recent advances in novel drug carrier systems*, InTech, Rijeka, 2012.
163. A. Swami, J. Shi, S. Gadde, A. R. Votruba, N. Kolishetti and O. C. Farokhzad, *Multifunctional nanoparticles for drug delivery applications: imaging, targeting, and delivery*, Springer, 2012.
164. A. Z. Wang, F. Gu, L. Zhang, J. M. Chan, A. Radovic-Moreno, M. R. Shaikh and O. C. Farokhzad, *Expert Opin. Biol. Ther.*, 2008, **8**, 1063-1070.
165. I. L. Medintz, H. T. Uyeda, E. R. Goldman and H. Matoussi, *Nature Mater.*, 2005, **4**, 435-446.
166. L. Wang, W. Zhao and W. Tan, *Nano Res.*, 2008, **1**, 99-115.
167. R. Hao, R. Xing, Z. Xu, Y. Hou, S. Gao and S. Sun, *Adv. Mater.*, 2010, **22**, 2729-2742.
168. N. Kamaly, Z. Xiao, P. M. Valenca, A. F. Radovic-Moreno and O. C. Farokhzad, *Chem. Soc. Rev.*, 2012, **41**, 2971-3010.
169. X. Liu, H. Lin, Q. Tang, C. Li, S. Yang, Z. Wang, C. Wang, Q. He, B. Cao, Z. Feng, X. Guan and J. Zhu, *PLoS ONE*, 2011, **6**, 19848-19856.
170. T. R. Daniels, E. Bernabeu, J. A. Rodríguez, S. Patel, M. Kozman, D. A. Chiappetta, E. Holler, J. Y. Ljubimova, G. Helguera and M. L. Penichet, *Biochim. Biophys. Acta*, 2012, **1820**, 291-317.
171. T. Minko, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2004, **56**, 491-509.

172. Z. J. Deng, M. Liang, M. Monteiro, I. Toth and R. F. Minchin, *Nature Nanotech.*, 2011, **6**, 39-44.
173. F. Danhier, O. Feron and V. Préat, *J. Contr. Rel.*, 2010, **148**, 135-146.
174. A. M. Derfus, G. von Maltzahn, T. J. Harris, T. Duza, K. S. Vecchio, E. Ruoslahti and S. N. Bhatia, *Adv. Mater.*, 2007, **19**, 3932-3936.
175. N. Singh, A. Agrawal, A. K. L. Leung, P. A. Sharp and S. N. Bhatia, *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, **132**, 8241-8243.
176. S. Ji, J. Xu, B. Zhang, W. Yao, W. Xu, W. Wu, Y. Xu, H. Wang, Q. Ni, H. Hou and X. Yu, *Cancer Biol. Ther.*, 2012, **13**, 206-215.
177. J. B. Delehanty, K. Boeneman, C. E. Bradburne, K. Robertson, J. E. Bongard and I. L. Medintz, *Ther. Deliv.*, 2010, **13**, 411-433.
178. C. A. Janeway, P. Travers, M. Walport, *Immunobiology: The immune system in health and disease*, Garland Science, New York, 2001.
179. B. Alberts, D. Bray and J. Lewis, *Molecular biology of the cell*, Garland Science, New York, 1994.
180. M. K. Yu, J. Park and S. Jon, *Theranostics*, 2012, **2**, 3-44.
181. N. K. T. Thanh and L. A. W. Green, *Nano Today*, 2010, **5**, 213-230.
182. M. De, P. S. Ghosh and V. M. Rotello, *Adv. Mater.*, 2008, **20**, 4225-4241.
183. C. M. Niemeyer, *Angew. Chem.*, 2001, **40**, 4128-4158.
184. L. C. Shiver-Lake, B. Donner, R. Edelstein, K. Breslin, S. K. Bhatia and F. S. Ligler, *Biosens. Bioelectron.*, 1997, **12**, 1101-1106.
185. R. Dev Das, S. Maji, S. Das and C. RoyChaudhuri, *Appl. Surf. Sci.*, 2010, **256**, 5867-5875.
186. E. Mahon, A. Salvati, F. B. Bombelli, I. Lynch and K. A. Dawson, *J. Contr. Rel.*, 2012, **161**, 164-174.
187. M. Di Marco, S. Shamsuddin, K. A. Razak, A. A. Aziz, C. Devaux, E. Borghi, L. Levy and C. Sadun, *Int. J. Nanomed.*, 2010, **5**, 37-49.
188. K. H. Bhandari, M. Newa, H. Uludag and M. R. Doschak, *Int. J. Pharm.*, 2010, **394**, 26-34.

189. S. K. Bhatia, L. C. Shriver-Lake, K. J. Prior, J. H. Georger, J. M. Calvert, R. Bredehorst and F. S. Ligler, *Anal. Biochem.*, 1989, **178**, 408-413.
190. J. Lee, T. S. Lee, J. Ryu, S. Hong, M. Kang, K. Im, J. H. Kang, S. M. Lim, S. Park and R. Song, *J. Nucl. Med.*, 2012, **54**, 1-8.
191. F. Chen, T. R. Nayak, S. Goel, H. F. Valdovinos, H. Hong, C. P. Theuer, T. E. Barnhart and W. Cai, *Mol. Pharm.*, 2014, June 17.
192. A. H. Faraji and P. Wipf, *Bioorg. Med. Chem.*, 2009, **17**, 2950-2962.
193. A. Z. Wang, R. Langer and O. C. Farokhzad, *Annu. Rev. Med.*, 2012, **63**, 185-198.
194. C. C. Anajwala, G. K. Jani and S. M. V. Swamy, *Intern. J. Pharm. Sci. Nanotechnol.*, 2010, **3**, 1043-1056.
195. N. S. Barakat, D. A. Bin Taleb and A. S. Al Salehi, *J. Nanomedic. Nanotechnol.*, 2012, **S4**, 1-9.
196. Y. H. Bae and K. Park, *J. Contr. Rel.*, 2011, **153**, 198-205.
197. R. Kumar, I. Roy, T. Y. Ohulchanskyy, L. N. Goswami, A. C. Bonoiu, E. J. Bergey, K. M. Trampusch, A. Maitra and P. N. Prasad, *ACS Nano*, 2008, **2**, 449-456.
198. O. C. Farokhzad, S. Jon, A. Khademhosseini, T.-N. T. Tran, D. A. LaVan and R. Langer, *Cancer Res.*, 2004, **64**, 7668-7672.
199. M. Liong, J. Lu, M. Kovichich, T. Xia, S. G. Ruehm, A. E. Nel, F. Tamanoi and J. I. Zink, *ASC Nano*, 2008, **2**, 889-896.
200. H. D. Han, L. S. Mangala, J. W. Lee, M. M. K. Shahzad, H. S. Kim, D. Shen, E. J. Nam, E. M. Mora, R. L. Stone, C. Lu, S. J. Lee, J. W. Roh, A. M. Nick, G. Lopez-Berestein and A. K. Sood, *Clin. Cancer Res.*, 2010, **16**, 3910-3922.
201. S. Sengupta and A. Kulkarni, *ACS Nano*, 2013, **7**, 2878-2882.
202. V. Mirshafiee, M. Mahmoudi, K. Lou, J. Cheng and M. L. Kraft, *Chem. Commun.*, 2013, **49**, 2557-2559.

-
203. S. Azarmi, Y. Huang, H. Chen, S. McQuarrie, D. Abrams, W. Roa, W. F. Finlay, G. G. Miller and R. Löbenberg, *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.*, 2006, **9**, 124-132.
204. P. Beck, D. Scherer and J. Kreuter, *J. Microencapsul.*, 1990, **7**, 491-496.
205. I. A. D. Bouchier and S. R. Cooperband, *Clinica Chimica Acta*, 1967, **15**, 303-313.
206. M. F. Bachmann, U. H. Rohrer, T. M. Kündig, K. Bürki, H. Hengartner and R. M. Zinkernagel, *Science*, 1993, **262**, 1448-1451.
207. Y. M. Kim, J. Y. Pan, G. A. Korbel, V. Peperzak, M. Boes and H. L. Ploegh, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2006, **103**, 3327-3332.
208. T. Storni, T. M. Kündig, G. Senti and P. Johansen, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2005, **57**, 333-355.
209. L. Deml, C. Speth, M. P. Dierich, H. Wolf and R. Wagner, *Mol. Immunol.*, 2005, **42**, 259-277.
210. T. Akagi, M. Baba and M. Akashi, *Adv. Polym. Sci.*, 2012, **247**, 31-64.
211. P. Daftarian, A. E. Kaifer, W. Li, B. B. Blomberg, D. Frasca, F. Roth, R. Chowdhury, E. A. Berg, J. B. Fishman, H. A. Al Sayegh, P. Blackwelder, L. Inverardi, V. L. Perez, V. Lemmon and P. Serafini, *Cancer Res.*, 2011, **71**, 7452-7462.
212. D. Mahony, A. S. Cavallaro, F. Stahr, T. J. Mahony, S. Z. Qiao and N. Mitter, *Small*, 2013, **9**, 3138-3146.
213. P. Sahdev, S. Podaralla, R. S. Kaushik and O. Perumal, *J. Biomed. Nanotechnol.*, 2013, **9**, 132-141.
214. D. M. Smith, J. K. Simon and J. R. J. Baker, *Nat. Rev. Immunol.*, 2013, **13**, 592-605.
215. A. Oshiba, H. Renz, J. Yata and E. W. Gelfand, *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 1994, **72**, 342-349.
216. I. J. Amanna and M. K. Slifka, *J. Immunol. Methods*, 2006, **317**, 175-185.

217. T. G. Phan, M. Amesbury, S. Gardam, J. Crosbie, J. Hasbold, P. D. Hodgkin, A. Basten and R. Brink, *J. Exp. Med.*, 2003, **197**, 845-860.
218. S. Malhotra, S. Kovats, W. Zhang and K. M. Coggeshall, *J. Biol. Chem.*, 2009, **284**, 24088-24097.
219. D. Nemazee, A. Gavin, K. Hoebe and B. Beutler, *Nature*, 2006, **441**, E4.
220. C. Pasare and R. Medzhitov, *Nature*, 2005, **438**, 364-368.
221. L. Genestier, M. Taillardet, P. Mondiere, H. Gheit, C. Bella and T. Defrance, *J. Immunol.*, 2007, **178**, 7779-7786.
222. I. Bray, A. Tivnan, K. Bryan, N. H. Foley, K. M. Watters, L. Tracey, A. M. Davidoff and R. L. Stallings, *Cancer Lett.*, 2011, **303**, 56-64.
223. T. A. Ishola and D. H. Chung, *Surg. Oncol.*, 2007, **16**, 149-156.
224. S. L. Cohn, A. D. J. Pearson, W. B. London, T. Monclair, P. F. Ambros, G. M. Brodeur, A. Faldum, B. Hero, T. Iehara, D. Machin, V. Mosseri, T. Simon, A. Garaventa, V. Castel and K. K. Matthay, *J. Clin. Oncol.*, 2009, **27**, 289-297.
225. J. M. Maris, *N. Engl. J. Med.*, 2010, **362**, 2202-2211.
226. U. K. Westermarck, M. Wilhelm, A. Frenzel and M. A. Henriksson, *Semin. Cancer Biol.*, 2011, **21**, 256-266.
227. F. Lamers, I. van der Ploeg, L. Schild, M. E. Ebus, J. Koster, B. R. Hansen, T. Koch, R. Versteeg, H. N. Caron and J. J. Molenaar, *Endocr.-Relat. Cancer*, 2011, **18**, 657-668.
228. A. Islam, H. Kageyama, N. Takada, T. Kawamoto, H. Takayasu, E. Isogai, M. Ohira, K. Hashizume, H. Kobayashi, Y. Kaneko and A. Nakagawara, *Oncogene*, 2000, **19**, 617-623.
229. B. M. Ryan, N. O'Donovan and M. J. Duffy, *Cancer Treat. Rev.*, 2009, **35**, 553-562.
230. R. Garzon, G. A. Calin and C. M. Croce, *Annu. Rev. Med.*, 2009, **60**, 167-179.
231. V. Havelange, C. E. A. Heaphy and R. Garzon, *Oncol. Rev.*, 2008, **2**, 203-213.

232. L. He and G. J. Hannon, *Genetics*, 2004, **5**, 522-531.
233. D. P. Bartel, *Cell*, 2004, **116**, 281-297.
234. M. Carleton, M. A. Cleary and P. S. Linsley, *Cell Cycle*, 2007, **6**, 2127-2132.
235. D. P. Bartel, *Cell*, 2009, **23**, 215-233.
236. G. A. Calin and C. M. Croce, *Nat. Rev. Cancer*, 2006, **6**, 857-866.
237. G. C. Shukla, J. Singh and S. Barik, *Mol. Cell Pharmacol.*, 2011, **3**, 83-92.
238. S. A. Melo and M. Esteller, *FEBS Letters*, 2011, **585**, 2087-2099.
239. P. Mestdagh, A.-K. Boström, F. Impens, E. Fredlund, G. Van Peer, P. De Antonellis, K. von Stedingk, B. Ghesquière, S. Schulte, M. Dews, A. Thomas-Tikhonenko, J. H. Schulte, M. Zollo, A. Schramm, K. Gevaert, H. Axelson, F. Speleman and J. Vandesompele, *Mol. Cell*, 2010, **40**, 762-773.
240. J. H. Schulte, B. Schowe, P. Mestdagh, L. Kaderali, P. Kalaghatgi, S. Schlierf, J. Vermeulen, B. Brockmeyer, K. Pajtler, T. Thor, K. de Preter, F. Speleman, K. Morik, A. Eggert, J. Vandesompele and A. Schramm, *Int. J. Cancer*, 2010, **127**, 2374-2385.
241. S. Yoon, Y.-C. Choi, S. Lee, Y. Jeong, J. Yoon and K. Baek, *FEBS Lett.*, 2010, **584**, 4048-4052.
242. Z. Wotschofsky, H.-A. Meyer, M. Jung, A. Fendler, I. Wagner, C. Stephan, J. Busch, A. Erbersdobler, A. C. Disch, H.-J. Mollenkopf and K. Jung, *Anal. Biochem.*, 2011, **417**, 233-241.
243. T. Mitic and J. S. McKay, *Toxicol. Pathol.*, 2005, **33**, 792-799.
244. J. Klesing, S. Chernousova and M. Eppele, *J. Mater. Chem.*, 2012, **22**, 199-204.

Anhang

Lebenslauf

Der Lebenslauf ist aus datenschutzrechtlichen Gründen in der digitalen Version nicht einzusehen.

Publikationsliste

Referierte Publikationen

1. K. Haedicke, D. Kozlova, S. Gräfe, U. Teichgräber, M. Epple and I. Hilger, "Multifunctional calcium phosphate nanoparticles for combining near-infrared fluorescence imaging and photodynamic therapy", *Acta Biomaterialia* (2014, erneut eingereicht nach der Revision)
2. G. Dördelmann, D. Kozlova und M. Epple, "A pH-sensitive poly(methyl-methacrylate) copolymer for efficient drug and gene delivery across the cell membrane", *Journal of Materials Chemistry B* 2 (2014) 7123-7131
3. G. Dördelmann, D. Kozlova, S. Karczewski, R. Lizio, S. Knauer und M. Epple, "Calcium phosphate increases the encapsulation efficiency of hydrophilic drugs (proteins, nucleic acids) into poly(D,L-lactide-co-glycolide acid) nanoparticles for intracellular delivery", *Journal of Materials Chemistry B* 2 (2014) 7250-7259
4. S. Ristig, D. Kozlova, W. Meyer-Zaika und M. Epple, "An easy synthesis of autofluorescent alloyed silver-gold nanoparticles", *Journal of Materials Chemistry B* 2 (2014) 7887-7895
5. V. Temchura, D. Kozlova, V. Sokolova, K. Überla und M. Epple, "Targeting and activation of antigen-specific B-cells by calcium phosphate nanoparticles loaded with protein antigen", *Biomaterials* 35 (2014) 6098-6105
6. Y. Dautova, D. Kozlova, J. N. Skepper, M. Epple, M. D. Bootman und D. Proudfoot, "Fetuin-A and albumin alter cytotoxic effects of calcium phosphate nanoparticles on human vascular smooth muscle cells", *PLOS ONE* 9 (2014) e97565

7. D. Kozlova, V. Sokolova, M. Zhong, E. Zhang, J. Yang, W. Li, Y. Yang, J. Buer, A. M. Westendorf, M. Epple und H. Yan, "Calcium phosphate nanoparticles show an effective activation of the innate immune response in vitro and in vivo after functionalization with flagellin", *Virologica Sinica* 29 (2014) 1-7
8. D. Kozlova und M. Epple, "Biological targeting with Nanoparticles: State of the Art", *BioNanoMaterials* 14 (2013) 161-170
9. K. Althoff, S. Lindner, A. Odersky, P. Mestdagh, S. Tillmann, J. Molenaar, S. Knauer, F. Speleman, M. Epple, D. Kozlova, S. Yoon, K. Baek, J. Vandesompele, A. Eggert, A. Schramm und J. H. Schulte, "miR-542-3p exerts tumor suppressive functions in neuroblastoma by downregulating Survivin", *International Journal of Cancer* (2014, im Druck)
10. V. Sokolova, D. Kozlova, T. Knuschke, J. Buer, A. M. Westendorf und M. Epple, "Mechanism of the uptake of cationic and anionic calcium phosphate nanoparticles by cells", *Acta Biomaterialia* 9 (2013) 7527-7535
11. D. Kozlova, S. Chernousova, T. Knuschke, J. Buer, A. M. Westendorf und M. Epple, "Cell targeting by antibody-functionalized calcium phosphate nanoparticles", *Journal of Materials Chemistry* 22 (2012) 396-404
12. A. Kovtun, D. Kozlova, K. Ganesan, C. Biewald, N. Seipold, P. Gaengler, W. H. Arnold und M. Epple, "Chlorhexidine-loaded calcium phosphate nanoparticles for dental maintenance treatment: combination of mineralising and antibacterial effects", *RSC Advances* 2 (2012) 870-875

Nichtreferierte Publikationen

D. Kozlova, S. Chernousova und M. Epple, "Synthese von Antikörper-funktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln", *Biomaterialien* 12 (2012) 142

Poster (P) und Vorträge (V)

1. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biomaterialien e.V. (DGBM), Dresden, 06.-08.11.2014, C. Hadjicharalambous, M. Chatzinikolaidou, D. Kozlova, J. Nelsen, V. Sokolova und M. Epple, "The effect of CaP/PEI/DNA-BMP-7/SiO₂-SH nanoparticles on the differentiation of MC3T3 cells" (P)
2. Jahrestagung des Interdisziplinären Netzwerks für Molekulare Bildgebung (INMB)-MoBi, Jena, 08.-10.10.2014, D. Kozlova, K. Haedicke, I. Hilger und M. Epple, "Multimodal design of fluorescent calcium phosphate nanoparticles for biomedical imaging and photodynamic therapy" (V)
3. 26st Annual Conference of the European Society for Biomaterials (ESB), Liverpool, UK, 31.08.-03.09.2014, C. Hadjicharalambous, D. Kozlova, V. Sokolova, M. Epple and M. Chatzinikolaidou, "Calcium phosphate nanoparticles carrying BMP-7 plasmid DNA induce osteogenic differentiation of MC3T3 pre-osteoblasts" (P)
4. 31st Annual Meeting of the Canadian Biomaterials Society, Halifax, Nova Scotia, Canada, 04.-07.06.2014, D. Kozlova, K. Haedicke, I. Hilger and M. Epple, "Multimodal calcium phosphate nanoparticles for *in vivo* imaging and photodynamic therapy" (V)
5. 31st Annual Meeting of the Canadian Biomaterials Society, Halifax, Nova Scotia, Canada, 04.-07.06.2014, G. Doerdelmann, D. Kozlova and M. Epple, "pH-Responsive calcium phosphate-polymer nanoparticles as a drug delivery system in gene therapy" (V)

6. 8. Winterseminar der Medizinischen Fakultät der Universität Duisburg-Essen, Pichl, Österreich, 17.-19.02.2014, D. Kozlova, K. Haedicke, I. Hilger und M. Eppe, "Near infrared labelled calcium phosphate nanoparticles for *in vivo* imaging and PDT" (V)
7. Microscopy Conference (MC), Regensburg, Germany, 25.08.-30.08.2013, K. Loza, D. Kozlova and M. Eppe, "Visualization of cell-nanoparticles interactions by scanning electron microscopy" (P)
8. International Union of Physiological Sciences (IUPS) conference, Birmingham, UK, 21.07.-26.07.2013, D. Proudfoot, Y. Dautova, D. Kozlova, M. Eppe, J. N. Skepper and M. D. Bootman, "Calcium phosphate crystals and cell death" (V)
9. 2nd Russian-German Workshop: "Biocompatible Materials and Coatings" (BMC-2013), Tomsk, Russian Federation, 24.02.-27.02.2013, J. Rüsing, D. Kozlova and M. Eppe, "Calcium phosphate nanoparticles for drug delivery" (V)
10. 2nd Russian-German Workshop: "Biocompatible Materials and Coatings" (BMC-2013), Tomsk, Russian Federation, 24.02.-27.02.2013, G. Dördelmann, D. Kozlova and M. Eppe, "Drug delivery from polymeric microparticles" (V)
11. Biomedical Engineering Society (BMES) Annual Meeting, Atlanta, Georgia, U. S., 24.10.-27.10.2012, K. Wallat, D. Kozlova and M. Eppe, "Electrophoretic deposition of bio-functionalized calcium phosphate nanoparticles" (P)

12. 4th Ukrainian-German Symposium on Physics and Chemistry of Nanostructures and on Nanobiotechnology, Ilmenau, Germany, 18.-20.09.2012, D. Kozlova, S. Chernousova and M. Epple, "Antibody-conjugated calcium phosphate nanoparticles for biomolecular cellular delivery" (V)
13. 9th World Biomaterials Congress, Chengdu, China, 01.06-05.06.2012, D. Kozlova, S. Chernousova, T. Knuschke, J. Buer, A. M. Westendorf and M. Epple, "Conjugation of antibodies to calcium phosphate nanoparticles for selective cell targeting" (V)
14. 53. Internationale Wissenschaftliche Konferenz der Technischen Universität Riga, Lettland, 04/2012, D. Kozlova und M. Epple, "Antibody-conjugated calcium phosphate nanoparticles" (V)
15. 6. Winterseminar der Medizinischen Fakultät der Universität Duisburg-Essen, Pichl, Österreich, 23.-26.02.2012, D. Kozlova und M. Epple, "Antikörper-konjugierte Calciumphosphat-Nanopartikel" (V)
16. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biomaterialien e.V. (DGBM), Gießen, 10.-12.11.2011, D. Kozlova, S. Chernousova und M. Epple, "Synthese von Antikörpern-funktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln" (P)
17. 11th International Symposium on Metal Ions in Biology and Medicine, Cambridge, Großbritannien, 20.06.-23.06.2011, D. Kozlova and M. Epple, "Fluorescent core/shell silica-coated hydroxyapatite nanoparticles for bioconjugation" (V)

18. 5th Late Summer Workshop on Nanoparticles and Nanomaterials in Aquatic Systems, Schloss Maurach, Lake Constance, 28.09.-01.10.2010, D. Kozlova, A. Peetsch and M. Epple, "Synthesis and characterization of silver-doped calcium phosphate nanoparticles" (V)
19. 3rd Ukrainian-German Symposium on Physics and Chemistry of Nanostructures and on Nanobiotechnology, Beregove, Ukraine, 06.-10.09.2010, D. Kozlova, A. Peetsch and M. Epple, "Synthesis and characterization of silver-doped calcium phosphate nanoparticles" (P)
20. 49. Internationale Wissenschaftliche Konferenz der Technischen Universität Riga, Lettland, 04/2008, D. Kozlova und V. Krilova, "Einfluss der Bestandteile des Mediums der Polymerisation auf die Korngrößenzusammensetzung von PMMA" (V)
21. 48. Internationale Wissenschaftliche Konferenz der Technischen Universität Riga, Lettland, 04/2007, D. Kozlova und M. Vorona, "Optimierung der katalytischen Aktivität auf dem Silikagel festgelegtes α -Chymotrypsins" (V)
22. 47. Internationale Wissenschaftliche Konferenz der Technischen Universität Riga, Lettland, 04/2006, D. Kozlova und M. Vorona, "Reaktion der Bromierung-Debromierung von 3-Quinuclidon" (V)

Danksagung

Ich danke,

Herrn Prof. Dr. M. Epple für die interessante und interdisziplinäre Themenstellung, für die verantwortungsvolle Betreuung und die guten Arbeitsbedingungen, für die zahlreichen Tagungen und mehrere Auflandsaufenthalte,

Frau Prof. Dr. A. M. Westendorf für die Begutachtung der Dissertation als Zweitgutachterin sowie für die erfolgreiche Kollaboration,

Herrn Prof. Dr. J. Buer und Herrn Dr. T. Knuschke für die *in vitro*- und *in vivo*-Untersuchungen, für die FACS-Messungen und die Auswertungen der Messdaten sowie für die geduldigen Erklärungen und Beantwortungen der Fragen,

Frau Prof. Dr. Hilger und Frau M.Sc. K. Haedicke für die ausgezeichneten *in vivo*-Aufnahmen, für die schnelle Durchführung der Experimente und Auswertung der Daten,

Herrn Prof. Dr. K. Überla und Herrn Dr. V. Temchura für die Durchführung der Zellexperimente und die thematische Einführung in die Virologie,

Frau Prof. Dr. A. Eggert und Frau Dr. K. Althoff für die erfolgreiche Zusammenarbeit sowie für viele *in vitro*- und *in vivo*-Untersuchungen,

Frau Prof. Dr. S. Knauer und Frau M.Sc. S. Karczewski für die *in vitro*-Untersuchungen und die ausführliche Einweisung in das CLSM,

Allen Kooperationspartnern aus China für die *in vitro*- und *in vivo*-Untersuchungen und schöne gemeinsame Zeit während meines Aufenthaltes in Wuhan,

Frau Dr. V. Sokolova für die vielen gemeinsamen Kooperationen, für die hilfreichen Diskussionen und den gemeinsamen Aufenthalt im TRR-60-Rahmen in China,

Frau M.Sc. S. Chernousova für die Einführung in die Zellkultur und die schöne Zusammenarbeit,

Frau M.Sc. K. Loza für die endlosen REM-Messungen, für die ständige Unterstützung und den schönen Urlaub am Asowschen Meer,

Herrn M.Sc. G. Dördelmann für die unkomplizierte und freundschaftliche Zusammenarbeit während der Promotion sowie für die Hilfsbereitschaft und wertvollen Diskussionen,

Herrn M.Sc. S. Ristig, Herrn Dr. S. Backhaus, Herrn Dr. J. Rüsing, Frau Dr. J. Petrack und Frau Dr. K. Wallat für die gemeinsame gleichzeitige Anfertigung der Doktorarbeit und die gegenseitige Unterstützung,

Frau M.Sc. S. Berger die Korrektur dieser Arbeit sowie für die schöne gemeinsame Zeit,

Herrn Dipl.-Ing. S. Boukercha für die vielen REM-Aufnahmen und die darauf folgende kompetente Einweisung sowie für die hilfreiche Diskussionsbereitschaft,

Frau K. Brauner und Frau V. Hiltenkamp für die analytische Charakterisierung der Proben. Mein großer Dank geht an Frau V. Hiltenkamp für die schöne gemeinsame Zeit in Sibirien,

Frau C. Fischer für die Hilfe mit dem Rechner und bei technischen Fragen sowie für die freundlichen Diskussionen,

Frau S. Kiefer für die stetige Hilfe bei der Anfertigung der Anträge und Aufträge,

Mein herzlicher Dank geht ebenfalls an Frau Dr. A. Kovtun für die Einführung in die Zellkultur, für die hilfreichen Ratschläge und die schöne gemeinsame Zeit in Essen,

Mein besonderer Dank geht an Herrn Dr. D. Mahl für die Korrektur dieser Arbeit sowie für die freundlichen netten Gespräche,

Herrn Dr. A. Peetsch, Herrn Dr. J. Klesing, Herrn Dr. J. Diendorf, Herrn Dr. J. Rüsing für die schöne gemeinsame Zeit bei der WBC-Tagung in Chengdu,

Allen Mitarbeitern aus dem AK Prof. M. Epple für die schöne gemeinsame Arbeit und Hilfsbereitschaft,

Meiner Familie für die Geduld, Liebe und Glaube.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel

"Kovalent funktionalisierte Calciumphosphat-Nanopartikel zur selektiven Adressierung von Zellen"

selbst verfasst und keine außer den angegebenen Hilfsmitteln und Quellen benutzt habe, und dass die Arbeit in dieser oder ähnlicher Form noch bei keiner anderen Universität eingereicht wurde.

Essen, im Juli 2014

(Diana Kozlova)